



TITLE:

大腸菌熱ショック蛋白質GroEの生理機能と熱ショック応答の制御機構(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

金森, 正明

CITATION:

金森, 正明. 大腸菌熱ショック蛋白質GroEの生理機能と熱ショック応答の制御機構. 京都大学, 1994, 博士(理学)

ISSUE DATE:

1994-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3075835>

RIGHT:

大腸菌熱ショック蛋白質GroEの生理機能と
熱ショック応答の制御機構

生物物理学専攻

金森正明

本論文では大腸菌の主要熱ショック蛋白質GroEの生理機能および熱ショック応答の制御機構を明らかにするために行った研究成果を報告する。その内容は2部に分けられ、第1部ではGroEの特異的な減少により他の熱ショック蛋白質の合成速度が増加するほか、数種の蛋白質の合成や翻訳後の修飾が影響を受けることを報告する。これらの成果は第2部で報告する異常蛋白質の合成、蓄積に伴う熱ショック蛋白質の合成誘導の機構を調べるきっかけとなった。第2部では大腸菌においては異常蛋白質の合成、蓄積は熱ショック遺伝子の転写因子である σ^{32} を安定化することにより、熱ショック遺伝子の発現を増加させることを報告する。

1、GroE蛋白質（GroELとGroESの2種の蛋白質を意味する）は大腸菌の主要な熱ショック蛋白質であり、全ての温度で菌の増殖に必要とされる。in vitroの実験や真核生物のGroEL類似体の働きからGroEの機能はいわゆる分子シャペロンとして新生の蛋白質の正常な折畳みを助けることだと考えられている。しかし生体内で実際にどのような蛋白質が正常な折り畳みにGroEを必要とするのかよくわかっていなかった。そこで私は生体内でGroEを必要とする蛋白質を系統的に調べることを目的として本研究を開始した。まず第一段階として37℃、定常状態で増殖中の細胞においてGroEの量の変動（減少）が個々の蛋白質の合成や安定性に及ぼす影響を調べた。染色体上のgroEオペロンを欠いた菌のなかで多コピープラスミド上のlacUV5プロ

モーター下流から *groE* オペロンを発現させることにより GroE の量を人為的に調節し得る系を作成した。この細胞は培地中に 40 μ M の濃度で発現誘導物質 (IPTG) が存在すると、増殖速度と GroE の量は野生株と同等であった。培地中に IPTG が存在しないと、GroE は野生株の 25 % まで減少するが、菌の増殖はわずかに悪くなるだけで、37 $^{\circ}$ C 以下では増殖可能だった。しかしこのように GroE が減少すると、少なくとも 13 個の蛋白質の細胞内含量に変化がみられた。量が増加しているものの中には一群の熱ショック蛋白質が含まれており、それは合成速度の増加のためだった。さらにその合成速度の増加は、熱ショック遺伝子の転写因子である σ^{32} の増加のために引き起こされていることがわかった。GroE の減少に伴い量が増加する他の蛋白質の中には *edd-eda* オペロンによりコードされている 2 つの酵素とリボソーム蛋白質 S6 が含まれており、グルコース代謝やリボソームの生合成に GroE が関与していることが示唆される。

2、原核生物、真核生物において生育温度の低温から高温へのシフトは熱ショック応答を引き起こす。しかし細胞内で温度変化がどのように伝えられて、熱ショック遺伝子の発現を誘導するのかよくわかっていない。温度シフト以外に細胞内での異常蛋白質の蓄積も熱ショック蛋白質の合成を誘導することから、温度シフト時に起こる異常蛋白質の蓄積が熱ショック応答の最初のシグナルではないかと考えられてきた。GroE の分子シャペロンとしての機能を考えると、第 1 部で示した GroE 減少に伴う熱ショック蛋白質の合成速度の増加は、1 つの可能性として異常蛋白質の蓄積により引き

起こされていることが予想された。しかし異常蛋白質が熱ショック蛋白質の合成を誘導する機構はまだわかっていなかった。そこで私はこのことを明らかにすることを目的として本研究を行った。大腸菌においてプロリンアナログであるアゼチジンカルボン酸の培地への添加、もしくはヒトのプロウロキナーゼを合成させることにより、温度シフトなしに熱ショック蛋白質の合成を誘導した。このような条件下で異常蛋白質の合成に伴い数分以内に熱ショック蛋白質の合成速度が増加した。温度シフト時と同じく、熱ショック蛋白質の合成誘導は σ^{32} の増加によるものであり、その増加の程度は熱ショック蛋白質の合成速度の増加を説明するのに十分であった。 σ^{32} の増加は通常非常に不安定なこの蛋白質が安定化されたためで、 σ^{32} の合成速度は全く変化がみられなかった。温度シフト時の σ^{32} の増加は安定化と翻訳段階での合成速度の増加の両方に起因することがわかっているため、これらの結果から大腸菌の熱ショック応答において、異常蛋白質の合成、蓄積による σ^{32} の安定化と σ^{32} の翻訳段階での合成誘導の少なくとも 2 つの経路の存在が明らかとなった。

目 次

序	1	第1部 GroE蛋白質の減少が蛋白質代謝に及ぼす影響： 定常状態での熱ショック蛋白質の合成速度の増加	20
熱ショック応答	1	結果	21
熱ショック蛋白質	2	プラスミドの構築	21
σ^{32} の量の調節機構	2	GroEの合成量を調節できる系(KY1880株)の開発	21
<i>rpoH</i> 欠失株の温度感受性はGroEの過剰量の合成により サプレスされる	3	KY1880株の増殖はIPTG濃度と温度に依存する	23
GroE蛋白質	4	GroEの減少が個々の蛋白質に及ぼす影響	27
GroEの機能	5	GroEの減少により熱ショック蛋白質の合成速度が増加する	31
第1部の研究の位置づけ	6	σ^{32} の安定化と合成速度の上昇による量の増加が 熱ショック蛋白質の合成速度を増加させる	31
熱ショック蛋白質による熱ショック遺伝子の発現調節	7	GroEの減少に伴い量に変化する蛋白質の同定	33
熱ショック応答のモデル	8	考察	38
第2部の研究の位置づけ	9	GroE減少により σ^{32} が安定化する機構	39
材料と方法	12	GroE減少により σ^{32} の合成速度が増加する機構	40
菌株、プラスミド、ファージ	12	GroE減少に伴い熱ショック蛋白質以外で量に変化する蛋白質	41
培地	14	今後の課題	42
試薬と酵素	15		
形質導入	15		
菌の培養条件	16		
ウエスタンブロッティング	16		
2次元ゲル電気泳動	17		
蛋白質の標識実験	17		
抗体沈殿	18		
蛋白質のアミノ酸配列の決定	18		

第2部 異常蛋白質の蓄積に伴う熱ショック蛋白質の合成誘導	45
結果	46
アゼチジンカルボン酸による熱ショック蛋白質の合成誘導は σ^{32} に依存する	46
異常蛋白質合成による熱ショック蛋白質の合成誘導は σ^{32} の量の増加による	49
異常蛋白質合成による σ^{32} の安定化	53
異常蛋白質の合成は σ^{32} の合成を誘導しない	57
過剰のDnaKは異常蛋白質合成による熱ショック蛋白質の合成誘導を抑制する	57
考察	61
σ^{32} の安定化の機構	62
σ^{32} の翻訳段階での合成誘導	63
大腸菌における熱ショック応答のモデル	63
謝辞	66
引用文献	67

序

熱ショック応答 原核生物、真核生物を問わず多くの生物において生育温度を低温から高温に移すと、一群の熱ショック蛋白質の合成が誘導される(Lindquist et al., 1988)。この温度シフトによる合成誘導を熱ショック応答と呼ぶ。大腸菌においても低温(30 °C)から高温(42 °C)に移すと、約20種の熱ショック蛋白質の合成が誘導される(Neidhardt et al., 1987; Yura et al., 1993)。誘導は5-10分後に最大となり、その後は徐々に減衰し、30-60分後には新しい定常状態に達する。

この合成誘導は転写段階で起こり、転写開始因子 σ^{32} が重要な役割を担っている(Neidhardt et al., 1987; Gross et al., 1990; Yura et al., 1993)。大腸菌の遺伝子の転写開始には、コア酵素としてのRNAポリメラーゼの他に σ 因子と呼ばれる転写開始因子が必要とされる。これまでにいくつかの σ 因子が同定され、その役割分担が報告されている。大部分の遺伝子の転写に必要とされる主要な σ 因子は σ^{70} であり、 σ^{32} は熱ショック遺伝子の転写に必要とされる。細胞を低温から高温に移すと σ^{32} の量が急激に増加し(Straus et al., 1987)、これに伴い熱ショック遺伝子の転写量が増加する。また σ^{32} の量の減少に伴い熱ショック応答の減衰が始まる。このことから熱ショック応答時には細胞内の他の σ 因子（主に σ^{70} ）と σ^{32} の量的なバランスにより、熱ショック遺伝子の発現が調節されていると考えられている。

熱ショック蛋白質 大腸菌には約20種の熱ショック蛋白質が存在する (Neidhardt et al., 1987)。その中で遺伝子が同定されているものが半分以上に及ぶ。熱ショック蛋白質は名前から高温での増殖にのみ必要とされる蛋白質という印象を与えるが、実際にはそうではなく、多くの蛋白質が全温度で非常に基本的な役割を担っている。これら熱ショック蛋白質の中には GroEL、GroES、DnaK、DnaJ、GrpE のようないわゆる分子シャペロンと呼ばれ、多くの蛋白質の折り畳みを助けているものや、Lon と ClpP のような蛋白質分解酵素が含まれており、熱ショック蛋白質が細胞内の蛋白質を「ゆりかごから墓場」まで面倒みていることが予想されている (Georgopoulos et al., 1990; Gross et al., 1990; Hendrick et al., 1993)。

GroEL、GroES、DnaK、DnaJ、HtpG、ClpB は進化的によく保存されており、真核生物の細胞中にも類似体が存在する (Georgopoulos et al., 1990)。

σ^{32} の量の調節機構 上述したように温度シフトに伴い σ^{32} の量が増加するが、これは安定化と合成誘導によることがわかっている (Gross et al., 1990)。 σ^{32} は定常状態では半減期が約 1 分と非常に不安定な蛋白質であるが、温度シフトと同時に約 10 倍安定化される。また合成速度も約 10 倍増加する (Straus et al., 1987)。それは翻訳段階で起こり、*rpoH* mRNA の 2 次構造が重要であることもわかっている (Yura et al., 1993)。安定化と合成誘導は一時的で、42 °C で培養を続けても数分以内に安定性はもとに戻り、合成速度も 30 °C の時の数倍のレベルまで減少する。これにより σ^{32} の量が減少し、熱ショック応答が減衰する (Straus et al., 1987)。

通常の温度シフト (30 °C から 42 °C) では σ^{32} の合成誘導は翻訳段階であるが、これ以外の条件では転写段階の調節もあることが報告されている。

rpoH 遺伝子は P1、P3、P4、P5 と呼ばれる 4 つのプロモーターを持っているが、例えば P3 プロモーターは 50 °C という致命的温度で活性化されたり、P5 プロモーターは培地中のグルコースの欠乏や、エタノールの添加により活性化されたりする (Gross et al., 1990; Yura et al., 1993)。

熱ショック応答は σ^{32} の量の変動により調節されているが、逆に 42 °C で増殖させた大腸菌を 30 °C に移すと σ^{32} の量は変わらないが、熱ショック蛋白質の合成速度が減少することも報告されており、条件によっては σ^{32} の活性の調節も起こっていることが考えられる (Gross et al., 1990)。

rpoH 欠失株の温度感受性は GroE の過剰量の合成によりサプレスされる

σ^{32} は菌の高温での増殖には必須であるが、低温では必要でない。しかし、このことは熱ショック蛋白質が単に高温での増殖にのみ必要とされるということの意味するのではなく、 σ^{70} を含めた少なくとも一部の熱ショック蛋白質は全温度で増殖に必須であり (Georgopoulos et al., 1990)、それらの遺伝子は σ^{70} 依存性のプロモーターも合わせ持っている。 σ^{32} をコードする *rpoH* 遺伝子の欠失株が分離され、熱ショックプロモーターを認識する σ 因子は σ^{32} だけしかいないことが示された (Zhou et al., 1988)。この株は 20 °C より高温で増殖できない。この株よりそれぞれ 30 °C、37 °C、40 °C まで増殖できるようになった種々の復帰変異体を分離できるが、これらのものを調べるといずれも細胞内で GroE が過剰に合成されていた (Kusukawa et al., 1988)。しか

もこれらの復帰変異体で合成されるGroEの量が多いものほど、増殖できる上限温度が高くなることが観察された。また欠失株に*groE*発現プラスミドを入れ、GroEを過剰に合成させることによっても同様の結果が得られた。このことは一群の熱ショック蛋白質の中でも特にGroEが、大腸菌の通常の生育温度(30-40 °C)での増殖において主要な役割を担っていることを示唆する。また野生株においても高温になるほど多量のGroEが合成されることが知られている(Herendeen et al., 1979)。

最近、*rpoH*欠失株中では変性した蛋白質が蓄積しているが、GroEを過剰に合成している復帰変異体中では変性蛋白質の蓄積の程度がかなり軽減されることも示された(Gragerov et al., 1992)。

GroE蛋白質 GroEはもともとファージの増殖に必要とされる宿主側の因子として同定された(Zeilstra-Ryalls et al., 1991)。GroEにはGroELとGroESの2つがあり、これらをコードする遺伝子 (*groEL*と*groES*) はオペロンを形成している。どちらも全ての温度で増殖に必須であり(Fayet et al., 1989)、 σ^{32} と σ^{70} に依存する2種のプロモーターを合わせ持ち、*rpoH*欠失株中でも少量発現されている。GroELは約57 KDaの蛋白質でドーナツ状の7量体が2つ重なった14量体を形成する。GroESは約10 KDaの蛋白質でドーナツ状の7量体を形成する。両者は共同して働く。

GroELは進化的によく保存された蛋白質であり、原核生物だけでなく真核生物のミトコンドリアや葉緑体にもアミノ酸配列にして約50 %のホモロジーを持つ類似体が存在する(Ellis et al., 1991; Zeilstra-Ryalls et al., 1991)。

またホモロジーは低いGroELとよく似た高次構造を持つ蛋白質が真核生物の細胞質内にも存在することが報告された(Trent et al., 1991; Gao et al., 1992)。約30 %のホモロジーを持つGroESの類似体も真核生物のミトコンドリアに存在することがわかった(Hartman et al., 1992)。

GroEの機能 次節で述べるような変異株等の解析から、GroEの機能は蛋白質の高次構造の形成を助けることであると予想されていた。近年、大腸菌のin vitroの転写、翻訳共役系で新しく合成された蛋白質に結合していることが示されたり(Bochkareva et al., 1988)、真核生物で発見された類似体の役割がまさに新生の蛋白質の高次構造の形成を助けることであったりして(Ellis et al., 1991; Hartl et al., 1992)、ますます注目されるようになってきた。

最近の精製蛋白質を使ったin vitroの多くの実験からGroEの働きを予測すると次のようになる(Hendrick et al., 1993)。まずリボソームで合成されつつある蛋白質にDnaKとDnaJが結合する。合成途中での折り畳みの開始は異常な高次構造を取る原因となりやすいため、DnaKとDnaJは翻訳が完了するまで折り畳みを抑制していると考えられる。次にこれらの複合体へのGrpEの結合とDnaKのATPの消費に伴う構造変化により、折り畳み途中の蛋白質がGroELに渡される。GroELに渡された折り畳み中間体はGroELの中央の穴の中で隔離された状態で折り畳みを完了する。この際に折り畳み中間体はなんどもGroELから離れたり、結合したりしながら徐々に折り畳まれた状態になっていくが、離れる時にはその度にGroESのGroELへの結合と、

GroELのATPの消費に伴う構造変化を必要とする。折り畳みを完了した蛋白質はGroELへの親和性がなくなり穴から抜け出す。

第1部の研究の位置づけ in vitroの実験からGroEの機能はかなりわかってきたが、では実際に細胞内でどのような蛋白質が最終的な構造をとるのにGroEを必要とするのかはよくわかっていなかった。以下にごく最近のものまでも含めてこれまでの報告を示す。

- 1、*groE*変異株ではファージの頭部もしくは尾部の形態形成が阻害される (Georgopoulos et al., 1972; Takano et al., 1972; Georgopoulos et al., 1973; Zweig et al., 1973)。
- 2、*groE*温度感受性変異株では非許容温度でDNAとRNAの合成が阻害される (Wada et al., 1984)。
- 3、野生型*groE*の高発現が*dnaA* (DNA複製開始蛋白質をコードする遺伝子)、*secA*、*secY* (ともに分泌装置をコードする遺伝子) 変異株の温度感受性をサプレスする (Fayet et al., 1986; Jenkins et al., 1986; Van Dyk et al., 1989)。
- 4、*groES*変異株の温度感受性が*rpoA* (RNAポリメラーゼの α サブユニットをコードする遺伝子) 中に起こった変異によりサプレスされる (Wada et al., 1987)。
- 5、*groE*変異株では異常蛋白質の分解が遅れる (Straus et al., 1988)。
- 6、*ssb* (1本鎖結合蛋白質をコードする遺伝子) 変異株の温度感受性が*groEL*中に起こった変異によりサプレスされる (Ruben et al., 1988;

Laine et al., 1992)。

- 7、*groE*変異株中ではUmuC (UV変異誘発に必要とされる蛋白質) が不安定になる (Donnelly et al., 1989; Donnelly et al., 1992)。
- 8、*groE*変異株では β -ラクタマーゼの分泌が遅れる (Kusukawa et al., 1989)。
- 9、*groE*変異株ではRNaseEの活性が落ちる (Sohlberg et al., 1993)。
- 10、*groE*変異株ではクエン酸合成酵素、ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ、ポリヌクレオチドリナーゼは正常に合成されるが折り畳みがうまくいかない (Horwich et al., 1993)。

これらの様々な蛋白質が正常な折り畳みにGroEを必要としていることが予想されるが、私はそれらに加えてさらに細胞内で正常な折り畳みにGroEを必要とする蛋白質を同定するために、細胞内のGroEを減少させ、蛋白質代謝に及ぼす影響を調べた。染色体上の*groE*オペロンを欠いた菌の中でプラスミド上で誘導物質 (イソプロピル - チオ - β - ガラクトシド; IPTG) により制御可能なプロモーターから*groE*を発現させる系を開発した。まず実験の第一段階として、37℃、定常状態でのGroEの減少が他の蛋白質の合成速度や安定性に及ぼす影響を調べた。合成速度が増加する蛋白質の中に一群の熱ショック蛋白質が含まれていることがわかった。熱ショック蛋白質の合成速度の増加は σ^{32} の増加のためだった。このほかにGroEの減少により*edd-eda*オペロンの発現が上昇していることや、リボソーム蛋白質S6の翻訳後の修飾が阻害されることがわかった。

熱ショック蛋白質による熱ショック遺伝子の発現調節 *dnaK*、*dnaJ*、

*grpE*の各熱ショック遺伝子変異株において、30 °C、定常状態で熱ショック蛋白質の合成速度が増加しているが、それは安定化による σ^{32} の増加が原因である(Straus et al., 1990)。最近DnaK、DnaJ、GrpE蛋白質は σ^{32} と結合することが示された(Gamer et al., 1992)。また精製したDnaKは σ^{32} と結合するが、 σ^{32} が安定化している*dnaK*変異株から精製された「変異を持つDnaK」は結合しない(Liberek et al., 1992)。これらのことから σ^{32} の素早い分解には σ^{32} がDnaK、DnaJ、GrpEと結合することが重要であると考えられている。

また*dnaK*、*dnaJ*、*grpE*の各変異株では熱ショック応答の減衰が起こらない(Straus et al., 1990)。この時には σ^{32} の安定化に加えて、合成速度も増加した状態が続くことが示された。ただし*dnaJ*変異株では42 °Cでの σ^{32} の分解速度は野生株の分解速度に戻る。

このようにDnaK、DnaJ、GrpEの熱ショック蛋白質が σ^{32} の分解と熱ショック応答後の σ^{32} の合成速度の低下に必要であることがわかり、自身の遺伝子の発現を調節する負のフィードバック機構が存在することが示された。

熱ショック応答のモデル 1、上述したような事実から、Strausらは熱ショック応答は温度シフトにより細胞内に蓄積した変性蛋白質（恐らくDnaKとの親和性が高い）が σ^{32} からDnaK（恐らくDnaJやGrpEも）を奪い取ることで引き起こされるというモデルを提唱している(Straus et al., 1990)。

2、DnaKは自己リン酸化とATPase活性を持っているが、McCartyらは精製したDnaKのこれらの活性が温度に依存して変化することからDnaKが直接温度変化を認識しているというモデルを提唱している(McCarty et al.,

1991)。

3、またリボソームの活性を阻害する抗生物質が熱ショック蛋白質の合成を誘導することから、VanBogelenらはリボソームが温度変化のセンサーになっているというモデルを提唱している(VanBogelen et al., 1990)。

これら3つのモデルが今までに出されているが、これらはお互いを排除するものではない。

第2部の研究の位置づけ 原核生物、真核生物において細胞内での異常蛋白質の合成が温度シフトなしに熱ショック蛋白質の合成を誘導することが知られている。大腸菌ではアミノ酸アナログや蛋白質合成阻害剤の培地への添加、異種蛋白質や折畳みのうまくいかない蛋白質の合成等が熱ショック蛋白質の合成を誘導する(Goff et al., 1985; Parsell et al., 1989)。このような場合にも σ^{32} が必要とされる。このことから熱により変性した既存の蛋白質もしくは合成後の折畳みが異常になった蛋白質が熱ショック応答の第一のシグナルとなっているのではないかと考えられてきた。Strausらはこのようなことも踏まえて上述したようなモデルを出した。このことを図示すると図1、Aのようになる。

一方、StrausらはDnaK、DnaJ、GrpE蛋白質は温度シフトによる σ^{32} の合成誘導には必要とされないことも示した(Straus et al., 1990)。すなわち*dnaK*、*dnaJ*、*grpE*各変異株もしくは*dnaK*、*dnaJ*欠失株中で温度シフトに伴い野生株と同様に σ^{32} の合成が誘導される。この結果から温度シフト時に σ^{32} の増加を引き起こす合成誘導と安定化は別の経路であることがわかり、図1、B

に示すように2つの可能性がでてくる。もし異常蛋白質が熱ショック応答の最初のシグナルとなっているなら、それは σ^{32} の合成誘導と安定化を同時に引き起こさなければならない。

第1部ではGroE減少に伴い熱ショック蛋白質の合成速度が増加していることを報告するが、これは σ^{32} の安定化と合成速度（転写段階）の上昇による σ^{32} の増加が原因であった。「考察」で述べるように、GroEの機能を見ると熱ショック蛋白質の合成速度の増加は異常蛋白質の蓄積による可能性がある。このことを図示すると図1、Cのようになる。異常蛋白質の合成、蓄積は実際に図1、B、Cのどこに位置するのか、私はこのような疑問点や矛盾点を解決するために、異常蛋白質の蓄積がどのように熱ショック蛋白質の合成を誘導するのかを大腸菌において温度シフトなしに異常蛋白質を合成させることにより解析を行った。プロリンアナログであるアゼチジンカルボン酸の培地への添加もしくは異種蛋白質であるヒトのプロウロキナーゼを合成させることにより熱ショック蛋白質の合成を誘導した。その結果このような条件下での熱ショック蛋白質の合成誘導は σ^{32} の安定化のみによる増加が原因となっていることがわかった。

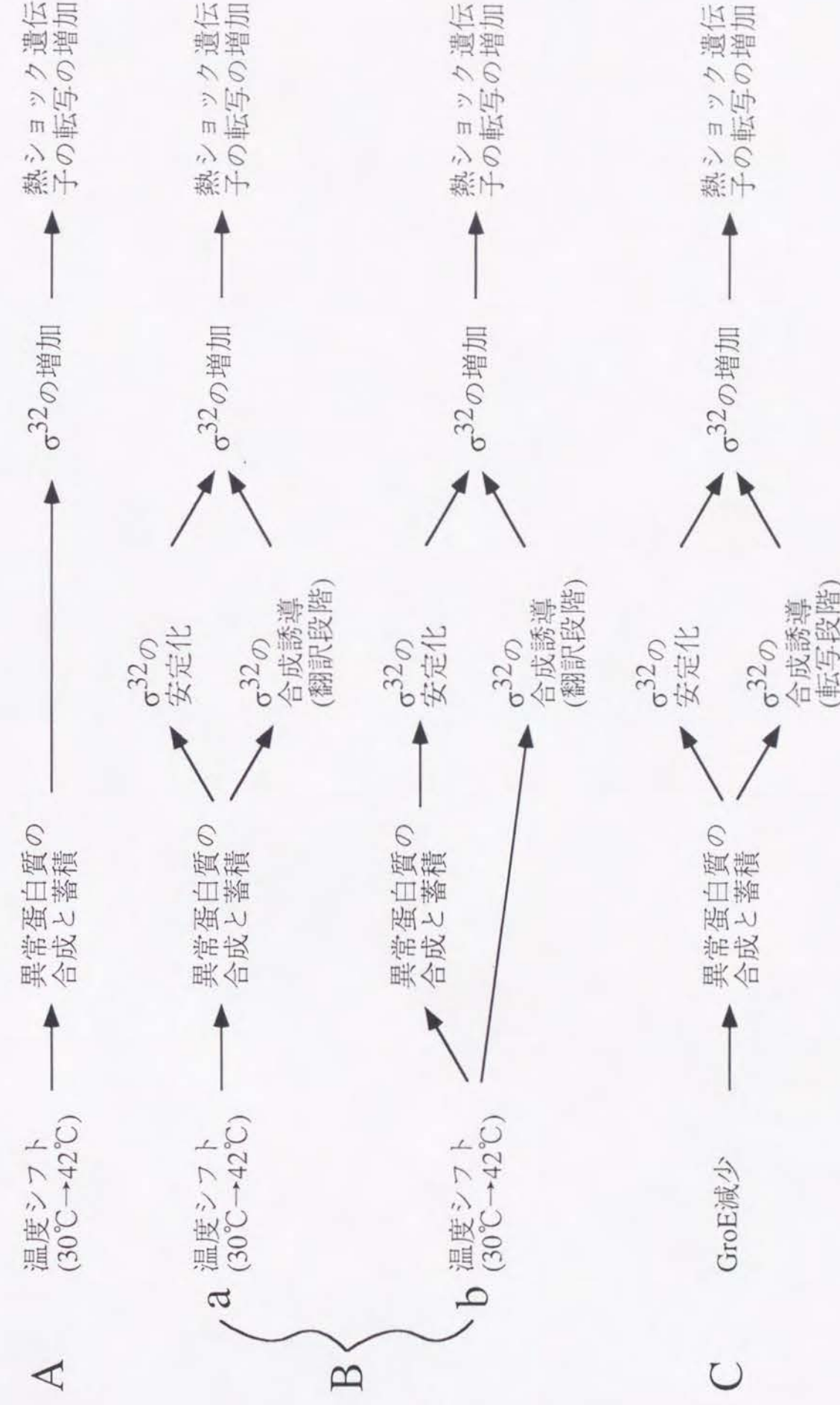


図1、異常蛋白質の合成、蓄積が熱ショック蛋白質の合成を誘導する経路
これまでの報告より予想される経路を示した。

材料と方法

菌株、プラスミド、ファージ 使用した大腸菌は全てK-12株の派生株であり、プラスミドは全て多コピープラスミドのpBR322から派生したものである。主な菌株とプラスミドを表1に示す。

FS1576(*recD*)はエキソヌクレアーゼの変異株であり、細胞内で直鎖状DNAの分解が阻害される。このためにこの株は相同組換えによる遺伝子置換に利用されている。KY1700はMC4100の*rpoH*遺伝子欠失株である。

この他にウエスタンブロッティングや抗体沈殿の実験において操作過程の紛失を補正するために分子量の小さくなった蛋白質を合成している変異株を実験に使った。分子量の小さくなった σ^{32} (*rpoH113*遺伝子産物)を合成している変異株と分子量の小さくなったDnaKを合成している変異株はC.

Grossの研究室で分離されたものを使った(Straus et al., 1987; Wild et al., 1992)。分子量の小さくなったGroELを合成している変異株は私が分離した*groEL79*株を使った(未発表データ)。分子量の小さくなった β -ガラクトシダーゼを合成している菌はJM103を使った(Yanisch-Perron et al., 1985)。

pB10aは*lacI*遺伝子と*lacUV5*プロモーターを持ち(図2)、大腸菌内でプロモーター下流に挿入された遺伝子の発現を培地中のイソプロピル-チオ- β -ガラクトシド(IPTG)の濃度により調節できる。pOF12はpBR322の*EcoRI*制限酵素部位に*groE*オペロンを含む染色体の約8 Kbp断片が挿入されたプラスミドである(図2)。pNRK416はpB10aから派生したプラスミドで、*lacUV5*プロモーター下流に*dnaK*遺伝子を持つ。pUK-02pmOは*lacI*遺伝子と

表1、使った菌株とプラスミド

Strain or plasmid	Relevant genotype	Source or reference
<i>E. coli</i> K-12 strains		
MC4100	F ⁻ <i>araD139</i> Δ (<i>argF-lac</i>) <i>U169</i> <i>rpsL150</i> <i>relA</i> <i>flbB5301</i> <i>deoC1</i> <i>ptsF25</i> <i>rbsR</i>	(Casadaban, 1976)
FS1576	C600 <i>thy</i> <i>recD1009</i>	(Stahl et al., 1986)
KY1880	MC4100 Δ <i>groE68::tet</i> harboring pKV1561	This study
KY1700	MC4100 Δ <i>rpoH30::kan</i>	T. Yura
Plasmids		
pBR322	<i>ori</i> (pMB1) <i>bla</i> <i>tet</i>	F. Bolivar
pB10a	<i>ori</i> (pMB1) <i>bla</i> <i>lacI</i> ^q <i>PlacUV5</i>	M. Imai
pOF12	<i>ori</i> (pMB1) <i>bla</i> <i>tet</i> <i>groES</i> <i>groEL</i>	(Fayet et al., 1986)
pKV1561	pB10a <i>PlacUV5-groES</i> <i>groEL</i>	This study
pKV1618	pOF12 Δ <i>groE68::tet</i>	This study
pNRK416	pB10a <i>PlacUV5-dnaK</i>	N. Kusakawa
pUK-02pmO	<i>ori</i> (pMB1) <i>bla</i> <i>lacI</i> ^q <i>Ptac-proUK</i>	M. Yamada

*tac*プロモーター下流にヒトのプロウロキナーゼ遺伝子を持ち、培地中のIPTGの濃度によりプロウロキナーゼ遺伝子の発現を調節できる。

形質導入にはP1ビルレントファージ (laboratory stock) を使った。 λ OF-0は*rpoH*と*lacZ*遺伝子間の融合オペロンを持つ λ ファージである(Nagai et al., 1990)。融合オペロンの転写調節は*rpoH*と同じだが、翻訳調節は異なる(Nagai et al., 1991)。

培地 0.5 %グルコース、2 μ g/mlチアミンを含むME合成培地を使った。第1部の実験にはメチオニンとシステインを除く18種類のL-アミノ酸を各20 μ g/mlで培地に加えた。プラスミドや系の構築にはL-培地を使い、培地中のIPTG、アンピシリン、テトラサイクンの濃度はそれぞれ150 μ M、50 μ g/ml、10 μ g/mlとした。第1部の実験では合成培地に抗生物質は加えなかった。

ME合成培地 (1 リットル pH 7.4)

MgSO ₄	0.2 g
Citric acid	2 g
K ₂ HPO ₄	10 g
NaNH ₄ HPO ₄	3.5 g

L-培地 (1 リットル pH 7.4)

Bacto-tryptone(Difco)	10 g
Yeast-extract(Difco)	5 g
NaCl	5 g

1 M NaOH 1.7 ml

寒天培地として用いる時には1.2%となるように寒天を加えた。

P1ファージを用いた形質導入の実験には上層寒天としてP培地を使った。

P培地 (1 リットル pH 7.4)

Poly-pepton	20 g
NaCl	5 g
1 M NaOH	5.6 ml

0.6 %となるように寒天を加えた。

試薬と酵素 L-³⁵S-メチオニン (>29.6 TBq/mmol) はAmerican Radiolabeled Chemicals社、(S)-(-)-2-アゼチジンカルボン酸はAldrich Chemical社、*AhaII*制限酵素はNew England Biolabs社より購入した。その他の試薬はナカライテスク社もしくは和光純薬工業社より、酵素は東洋紡績社もしくは宝酒造社より購入した。

形質導入 形質導入にはP1ファージを使った。P1ファージは大腸菌内で複製をする際に、低い頻度で自身のDNAではなく大腸菌の染色体をファージ粒子の中に取り込むことがある。その長さはファージDNAと同じくらいで約100 Kbpとされている。このような大腸菌のDNAを取り込んだファージが別の大腸菌に感染すると、相同組換えにより感染を受けた大腸菌の形質が変わる。

ここでは「Experiments with gene fusions」(Silhavy et al., 1984)に記載され

ている方法に従った。

菌の培養条件 第1部で実験に用いたKY1880株($\Delta groE68::tet$ harboring pKV1561)と第2部で実験に用いたKY1700株($\Delta rpoH$)は長時間培養すると、それぞれIPTG非依存的に*groE*を高発現したり、高温で増殖できるようになる復帰変異株の割合が増えてくる。これらのことを避けるためにこれらの株を使った実験では、一度L-培地で増殖させてから合成培地に植え継ぎ、これをプレカルチャーとした。実験にはこのプレカルチャーを希釈してさらに同じ合成培地に植え継ぎ、吸光度(A_{600})が0.3-0.4となった対数増殖期の細胞を用いた。第1部の実験ではプレカルチャーの段階から培地にIPTGを加えた。

菌の増殖は培養液を少量分取し、DU-64 spectrophotometer(Beckman)を使い濁度(吸光度、 A_{600})を測定した。

ウエスタンブロッティング 菌を冷却した同量の10%トリクロロ酢酸(TCA)と混合し、氷中に15分間静置した。遠心してアセトンで2回洗い、1% SDSを含む50 mM トリス緩衝液(pH 8.0)に懸濁した。煮沸後Micro BCA Protein Assay Reagent(Pierce)で蛋白質の濃度を測定した。サンプル間の蛋白質量を合わせて同量の2倍濃度のサンプルバッファー(125 mM トリス緩衝液(pH 6.8)、4% SDS、10% β -メルカプトエタノール、20% グリセロール、色素としてブロモフェノールブルー)と混合し、ゲル電気泳動を行った(Laemmli, 1970)。GroELを調べるときは6%、 σ^{32} を調べるときは10%ゲ

ル濃度でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。操作過程の紛失を補正するため、泳動前にそれぞれ分子量の小さくなった変異蛋白質を合成している菌の溶菌液を各サンプルに同量加えた。泳動後蛋白質をメンブレンに移した。メンブレンはDurapore membrane filter (Nihon Millipore Kogyo社)を使用した。目的とする蛋白質に対する抗体、anti-rabbit immunoglobulinbiotinylated antibodyおよびhorseradish peroxidase-streptavidin (ともにAmersham社)でメンブレンを処理した。バンドの検出はKonica Immunostaining HRP Kit IS-50B (Konica社)もしくはECL Western blotting detection reagents(Amersham)で行った。定量にはBiomed densitometer 2-D data system (Biomed Instruments社)を使った。

2次元ゲル電気泳動 細胞を冷却した10 mM トリス緩衝液(pH 8.0)と混合して急冷した。同じ緩衝液で1回洗った後、15 mM酢酸マグネシウムを含む10 mM トリス緩衝液(pH 7.8)10 μ lに懸濁した。10 mg/mlのリゾチームを1 μ l加え、凍結(dry-ice/ethanol中で)-融解の操作を3-5回繰り返して細胞を壊した。DNaseIとRNaseAの混合液(各1 mg/ml)を1 μ lと10% NP40を2 μ l加え、氷中に30分静置した。尿素を15 mgとO'Farrell lysis bufferを30 μ l加えて、尿素を溶かした後、20-30 μ lを泳動し、残りは-20°Cで凍結保存した。1次元目はpH 5-7もしくはpH 3-10の範囲で、2次元目は13%のゲル濃度で泳動した(O'Farrell, 1975; O'Farrell et al., 1977)。

蛋白質の標識実験 合成培地で対数増殖期の細胞に 35 S-メチオニンを

100 $\mu\text{Ci/ml}$ となるように加えた。2分後に5 %TCAで処理し、アセトンで洗った。サンプルバッファー(62.5 mM トリス緩衝液(pH 6.8)、2 % SDS、5 % β -メルカプトエタノール、10 %グリセロール、色素としてブロモフェノールブルー)に懸濁し、煮沸した。液体シンチレーションカウンター(Aloka)で取り込まれた ^{35}S -メチオニンを測定して、サンプル間のカウントを合わせて10 %濃度のゲルに流した。

抗体沈殿 ^{35}S -メチオニンで標識した細胞を5 %TCAで処理し、アセトンで洗った。1 % SDSと1 mM EDTAを含む50 mM トリス緩衝液に懸濁し、煮沸後取り込まれた ^{35}S -メチオニンを測定した。サンプル間のカウントをそろえて、トライトン緩衝液(50 mM トリス緩衝液(pH 8.1)、0.15 M NaCl、0.1 mM EDTA、2 % TritonX100)で希釈後、抗体を加えた。操作過程の紛失を補正するために抗体を加える前に分子量の小さくなった変異蛋白質を合成している菌の溶菌液を同量加えた。一晚4 $^{\circ}\text{C}$ で静置した後、IgG sorb(the enzyme center社)もしくはProteinA Sepharose(Pharmacia社)を加えて4 $^{\circ}\text{C}$ で1時間置くことにより抗体-抗原複合体を沈殿させた。トライトン緩衝液と10 mM トリス緩衝液(pH 8.1)で1回ずつ洗い、サンプルバッファーに懸濁した。煮沸後、ゲル電気泳動を行った。DnaKと σ^{32} を見る時は10 %濃度、GroELと β -ガラクトシダーゼを見る時は6 %濃度のゲルを使用した。バンドの検出と定量には富士フィルム社のBio-Image Analyzer BAS2000を使った。

蛋白質のアミノ酸配列の決定 全蛋白質を2次元ゲル電気泳動により

ゲル上に展開した後、ポリビニリデンフルオリド(PVDF)膜 (Applied Biosystems社)に移した。膜をコマジープリリアントブルー (CBB) で染色後、目的の蛋白質に当たるスポットを切り出し、protein sequencer model 473A (Applied Biosystems社)で解析を行った。得られた結果を相同性検索プログラムFASTA(Pearson et al., 1988)を用いてGenBank登録データと比較した。

第 1 部

GroE蛋白質の減少が蛋白質代謝に及ぼす影響：定常状態での熱ショック蛋白質の合成速度の増加

結 果

プラスミドの構築 pB10aのXhoI - BamHI断片をpOF12のgroEオペロンを含むAhaII断片(2.2 Kbp)で置換し、pKV1561を構築した(図2)。groEオペロンをlacUV5プロモーター下流に挿入したため、このプラスミドを持つ細胞では培地中のイソプロピル - チオ - β - ガラクトシド(IPTG)の濃度によりGroE蛋白質の合成量を調節できるようになった(図4、B)。

pOF12のSacII - SmaI断片(1.9 Kbp)をpBR322のテトラサイクリン耐性遺伝子を含むEcoRI - Aval断片(1.4 Kbp)で置き換えてpKV1618を構築した(図2)。SacII制限酵素部位はgroES遺伝子の36-38番目のコドン内にあり、SmaI制限酵素部位はgroEオペロンの転写終結部位にある。

GroEの合成量を調節できる系 (KY1880株) の開発 groE発現プラスミド(pKV1561)を持つFS1576(recD)株にpKV1618をEcoRIで消化し直鎖状にして入れ、形質転換を行った。37℃、L-培地、IPTG存在下でテトラサイクリン耐性となるものを選択した。得られた形質転換株のいくつかは42℃での増殖に培地へのIPTGの添加を必要とした。サザンブロッティングによりこれらの形質転換株は染色体上のgroEオペロンがtet遺伝子で置き換わっていることを確認した(未発表データ)。この置き換わった領域($\Delta groE68::tet$)をP1ファージを用いてIPTG存在下でpKV1561を持つMC4100株(recD⁺)に移した。形質導入株の1つをKY1880と名付け、以後の実験に用いた。

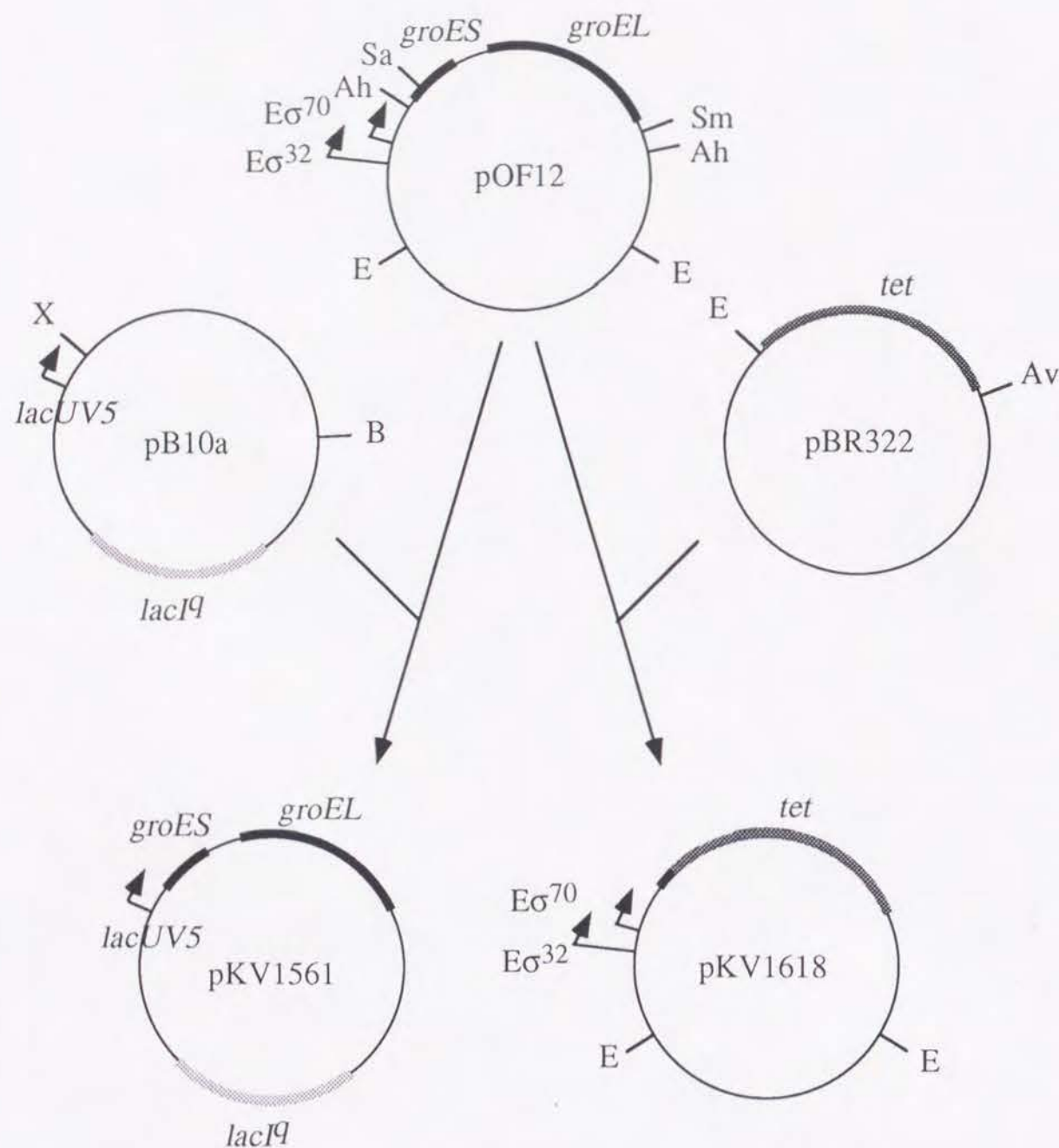


図2、プラスミドの構造

構築の手順は本文中で述べた。関連する遺伝子、プロモーター、制限酵素部位を強調したため、それぞれの大きさは正確ではない。Eσ³²、Eσ⁷⁰はそれぞれσ³²、σ⁷⁰依存性のプロモーターを示す。制限酵素部位は1もしくは2文字で表した。Ah、AhaII；Av、AvaI；B、BamHI；E、EcoRI；Sa、SacII；Sm、SmaI；X、XhoI

KY1880株の増殖はIPTG濃度と温度に依存する。最初の期待とは異なり、KY1880株は増殖は少し悪くなるが、37℃以下でIPTGを含まない合成培地で増殖可能であった。しかし42℃での増殖は培地中のIPTG濃度に依存していた（図3）。37℃定常状態で増殖している菌の増殖曲線を図4、Aに示す。IPTGが20μM以上の濃度で培地中に含まれていると、増殖速度は野生株とほとんど変わらなかった。IPTGを含まない培地では増殖速度が遅くなり、ダブリングタイム（濁度が2倍になるのに要する時間）にして約1.2倍長くなった。またGroELをウエスタンブロッティングにより定量すると、培地中のIPTG濃度に依存して変化した（図4、B）。40μMのIPTG濃度の時、野生株(MC4100)に匹敵する量のGroELが存在しており、IPTGがない時でも野生株の約25%のGroELが存在することがわかった。これはLacIリプレッサー蛋白質によるlacUV5プロモーターからの転写の抑制が完全ではないからと考えられる。このためにKY1880株はIPTGを含まない合成培地でも37℃以下では増殖できると思われる。2次元ゲル電気泳動後のゲル上のスポットの大きさを比較するとGroESの量の変化もGroELとよく似ていた（図5）。これらの結果は増殖温度が高くなるにつれてより多くのGroEが必要とされることを示している。

以下の多くの実験では野生株に匹敵する量でGroEが存在する40μMのIPTG濃度（IPTG存在下）と野生株の25%まで減少するIPTGを加えない（IPTG非存在下）場合を比較することにより、GroEの減少が個々の蛋白質の代謝に及ぼす影響を調べた。

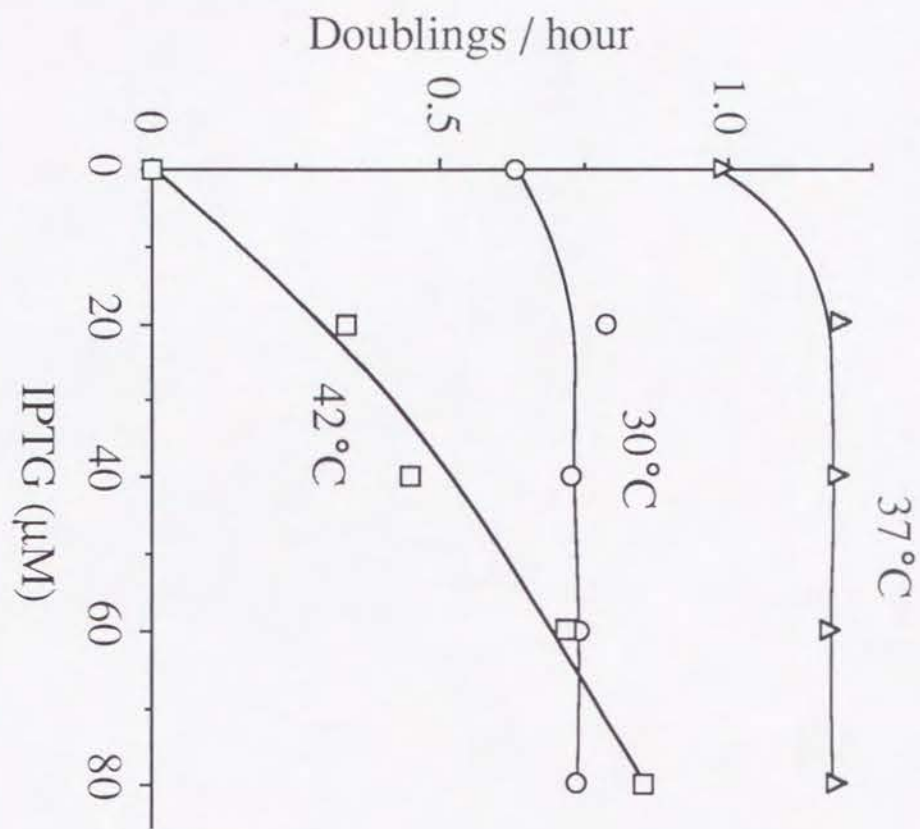


図3、培地中のIPTG濃度と増殖速度
示した濃度のIPTGを含む合成培地でそれぞれの温度でKY1880株を増殖させ、吸光度 (A_{600}) を測定した。縦軸は1時間当たりの菌の分裂回数で表した。

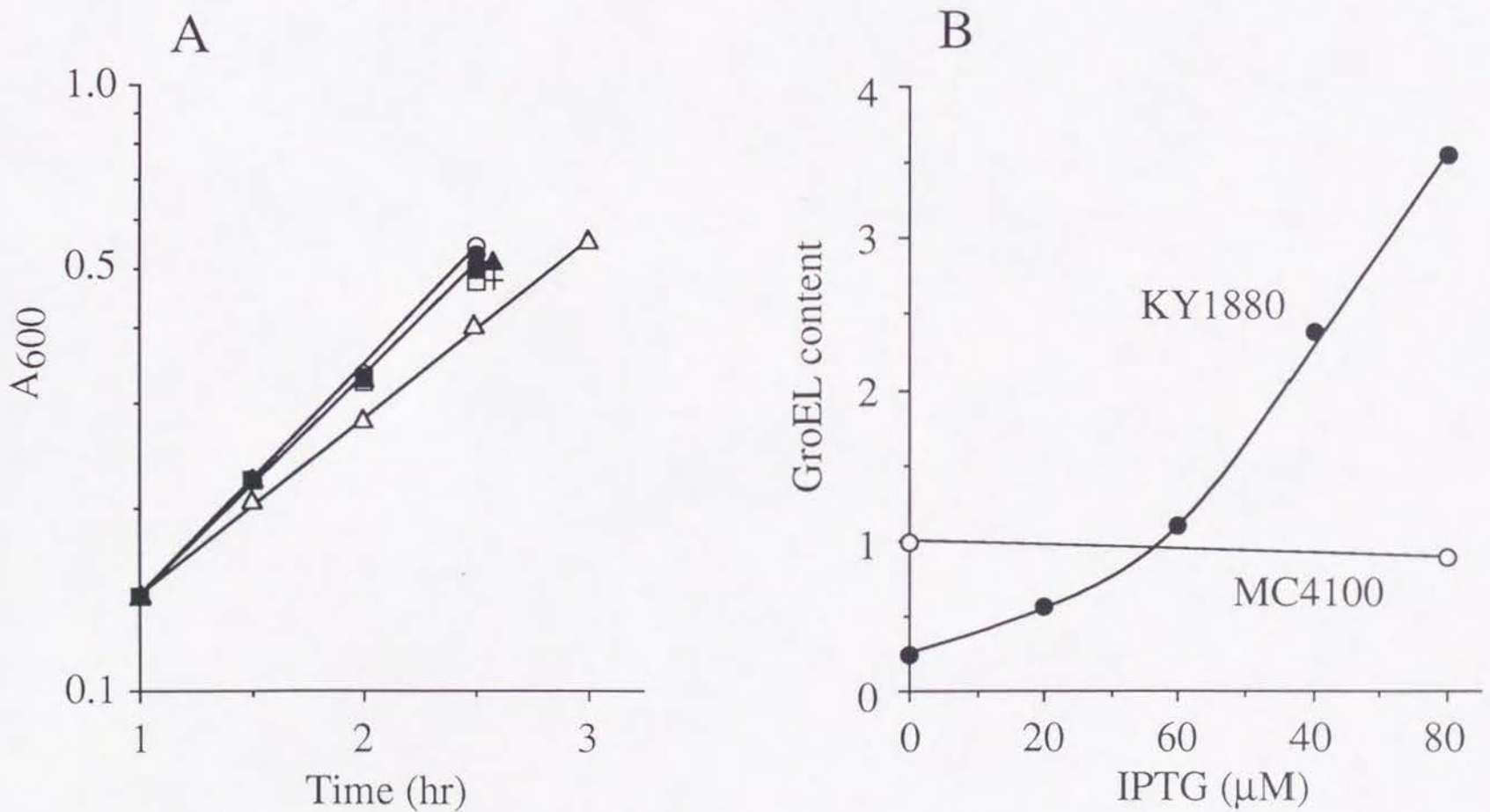


図4、37℃での増殖に対するIPTG濃度の影響とGroELの含量

A、37℃、示した濃度のIPTGを含む合成培地で菌を増殖させ、吸光度(A_{600})を測定した。横軸は菌を植えてからの時間を示す。○、野生株(MC4100) IPTG なし；●、野生株(MC4100) IPTG 80μM；△、KY1880 IPTG なし；▲、KY1880 20μM；□、KY1880 40μM；■、KY1880 60μM；⊕、KY1880 80μM
B、Aの条件で増殖させた菌のGroEL含量をウェスタンブロッティングにより定量した。IPTG非存在下で増殖させた野生株のGroELの量を1とし、3回の実験の平均を示した。○、野生株 (MC4100)；●、KY1880

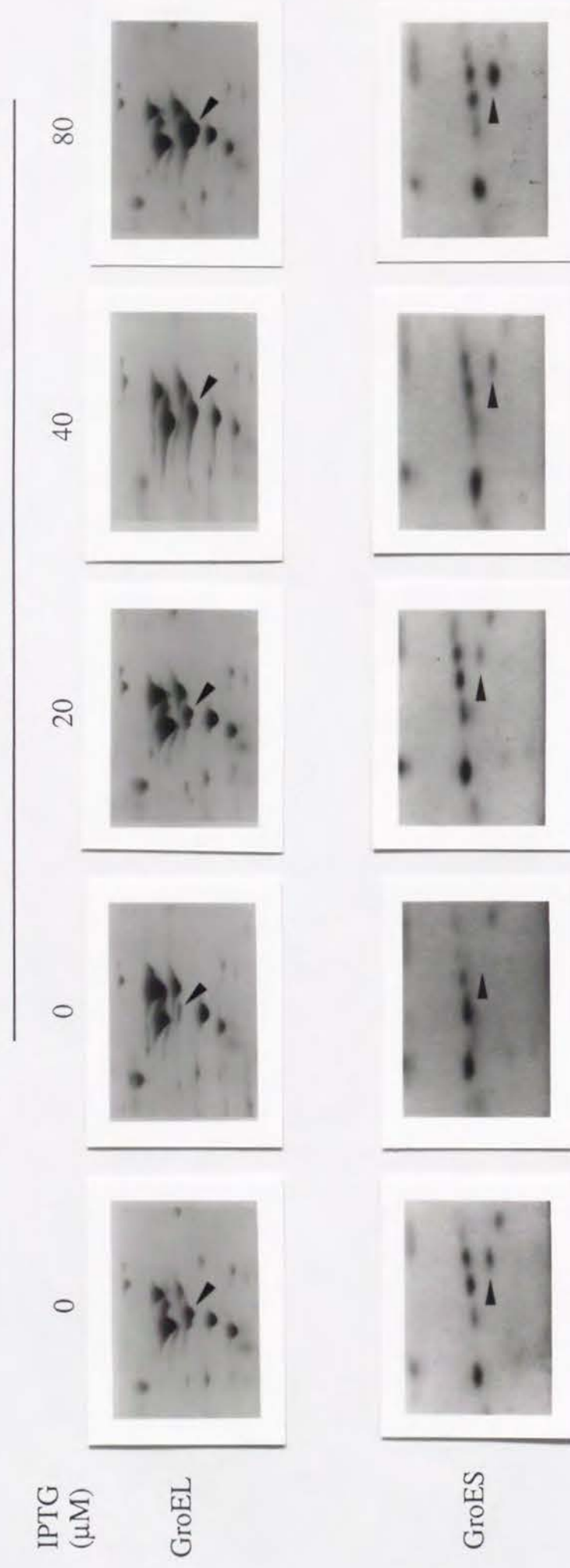


図5、IPTG濃度とGroEの量

37℃、示した濃度のIPTGを含む合成培地で増殖させた菌の全蛋白質を、2次元ゲル電気泳動によりゲル上に展開した。ゲルをコマジーブリリアントブルーで染色した。GroELとGroESのスポット(矢印)を含む領域のみを示した。

GroEの減少が個々の蛋白質に及ぼす影響 IPTG存在下(40 μM)、非存在下で増殖させたKY1880株の全蛋白質を2次元ゲル電気泳動法によりゲル上に展開して、コマジーブリリアントブルーで染色した(図6、A、B)。蛋白質のパターンを比較すると、GroEの減少に伴い少なくとも13個の蛋白質の量が再現性よく変化していた。図6に示したゲルのpHの範囲は5-7で一部の塩基性の蛋白質がゲル上に現れていない。pHの範囲を3-10に広げて泳動を行ったが、再現性よく顕著な変化を示すものは図6の中の13個のものであった(未発表データ)。13個の蛋白質のうち8個の量が増加しており、5個が減少していた。野生株(MC4100)をIPTG存在下(40 μM)、非存在下で増殖させたときの全蛋白質のゲルパターンはIPTG存在下(40 μM)で増殖させたKY1880株と同じであり(未発表データ)、この条件でGroE減少の影響を調べる事が可能であることがわかった。

観察された変化がそれぞれの蛋白質の合成速度の変化によるのか、それとも安定性の変化によるのかを調べるために、細胞を³⁵S-メチオニンで30秒間標識し、大量の非放射性のメチオニンでチェイスする実験(パルス-チェイス実験)を行った。非放射性メチオニンを加えてから30秒、2、4、8、16分後に菌を分取し、2次元ゲル電気泳動を行いそれぞれのゲルパターンを比較した結果、GroEの減少に伴い7個(#1, 2, 3, 4, 6, 7, 10)の蛋白質の合成速度が増加し、2個(#8, 9)が減少していた(図7、A、B)。また1個(#11)の蛋白質の安定性が増加し(図8、E-H)、1個(#5)が減少していた(図8、A-D)。加えて2個(#12, 13)の蛋白質の翻訳後の修飾が遅れることもわかった(図8、E-H)。これら2個の蛋白質はIPTG存在下で増

IPTG (μM)

40

0

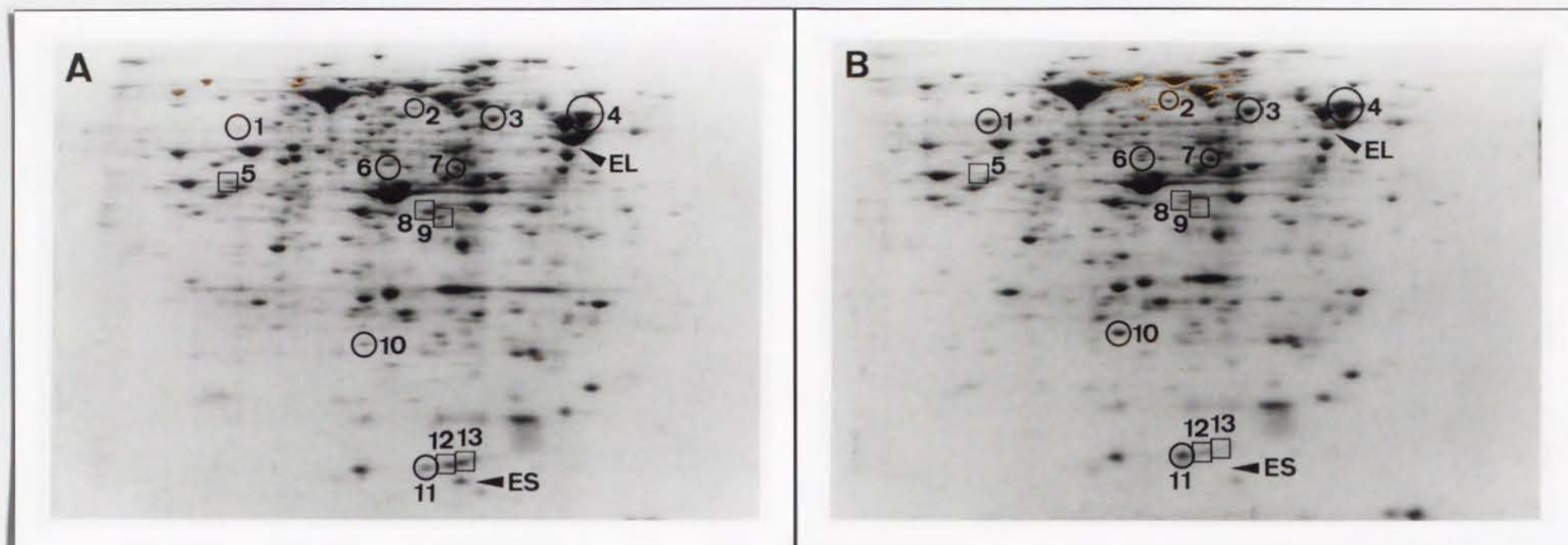


図 6、GroE減少に伴う個々の蛋白質の量的変化

37 $^{\circ}\text{C}$ 、合成培地でIPTG存在下 (40 μM)、非存在下で増殖させたKY1880株の全蛋白質を2次元ゲル電気泳動によりゲル上に展開した。ゲルをコマジーブリリアントブルーで染色した。各ゲルのpHの範囲は5-7で、右側が酸性。○、GroEの減少に伴い量が増加する蛋白質；□、量が減少する蛋白質

IPTG (μM)

40

0

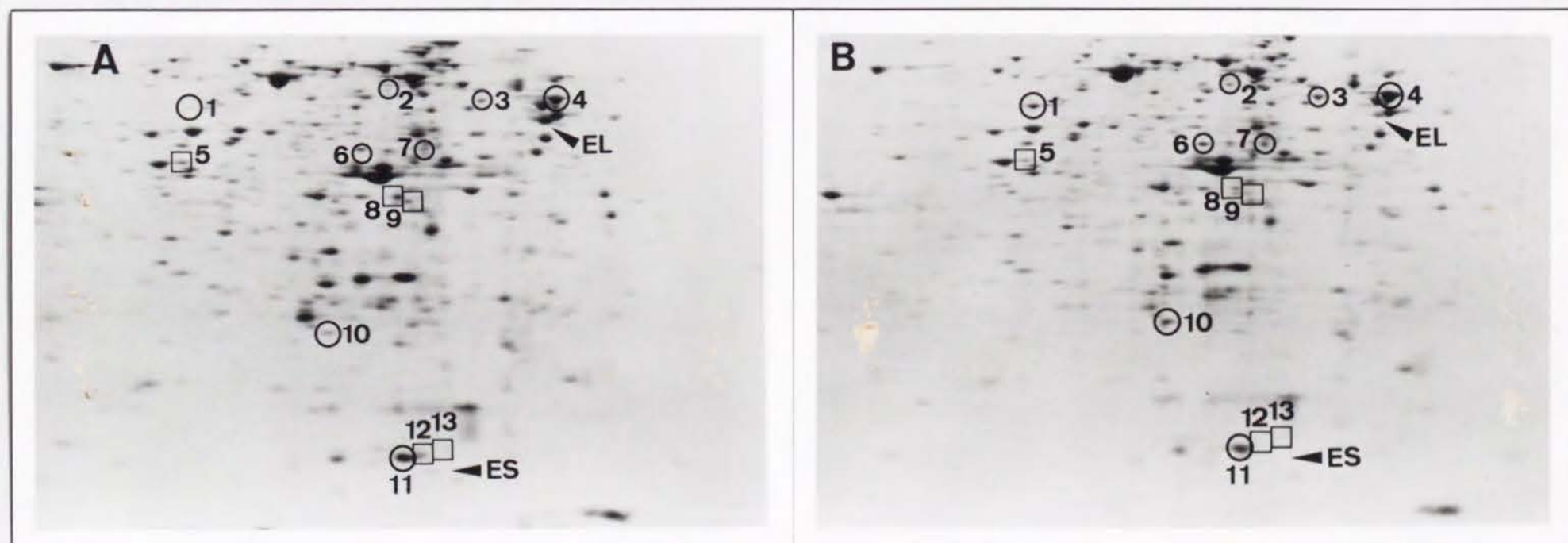


図 7、GroEの減少に伴い量に変化する蛋白質の合成速度の変化

37 $^{\circ}\text{C}$ 、合成培地でIPTG存在下 (40 μM) もしくは非存在下でKY1880株を増殖させ、100 $\mu\text{Ci/ml}$ の ^{35}S -メチオニンで30秒間標識した。大量の非放射性メチオニン (200 $\mu\text{g/ml}$) を加えて30秒後に菌を採取し、その全蛋白質を2次元ゲル電気泳動によりゲル上に展開した。オートラジオグラフを示す。pHの範囲は5-7で、右側が酸性。○、GroEの減少に伴い量が増加する蛋白質；□、量が減少する蛋白質

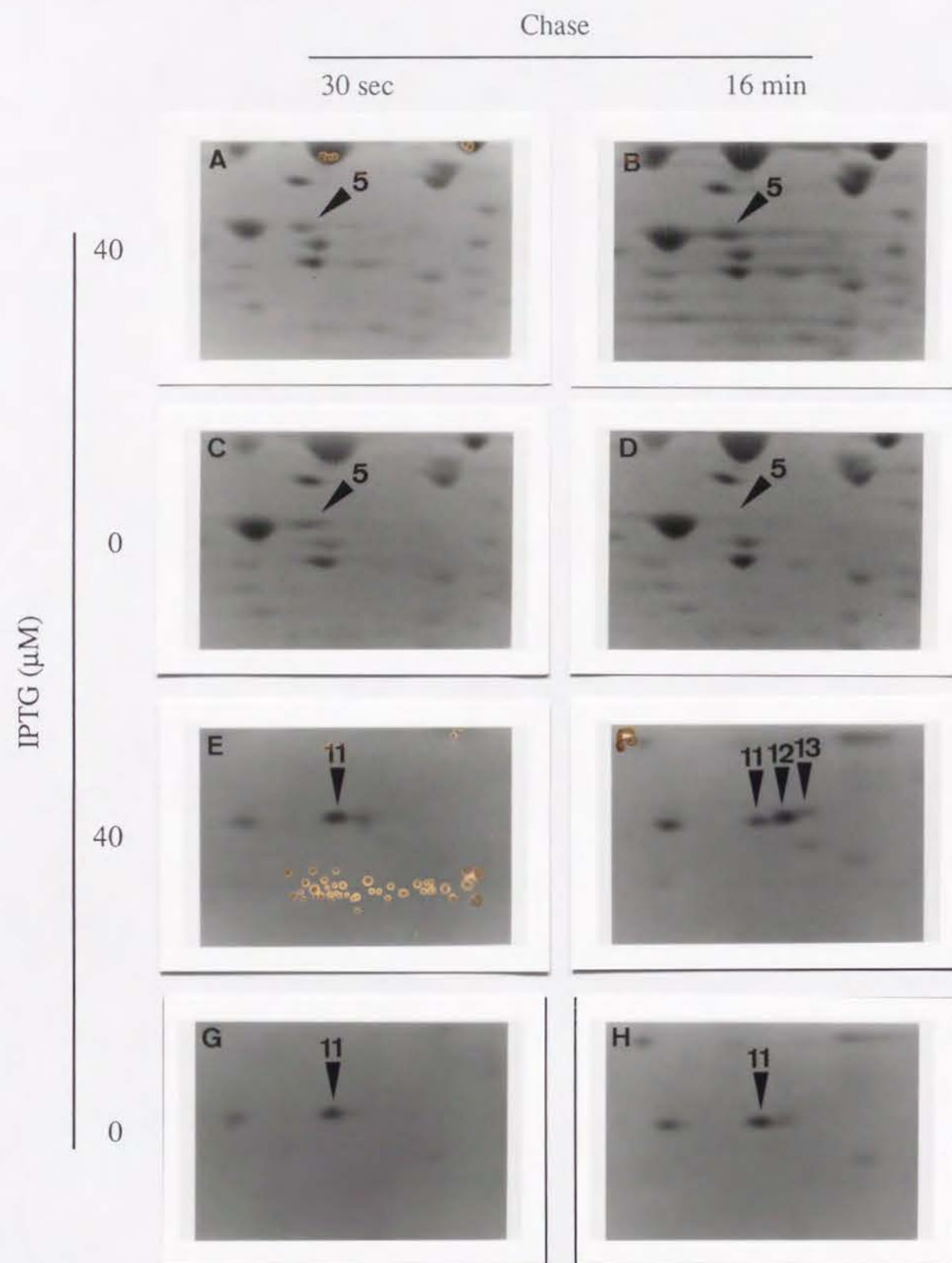


図8、GroE減少に伴い量が変化する蛋白質の安定性と合成後の修飾の変化

37℃、合成培地でIPTG存在下(40μM)、非存在下でKY1880株を増殖させ、100 μCi/mlの³⁵S-メチオニンで30秒間標識した。大量の非放射性メチオニンを加えて、30秒、2、4、8、16分後に菌を分取し、その全蛋白質を2次元ゲル電気泳動によりゲル上に展開した。チェイス30秒と16分のオートラジオグラフの#5(A-D)と#11、12、13(E-H)を含む領域のみを示す。

殖させた時においてのみ長時間(8-16分)チェイスしたゲル上に現われた。このように翻訳後の修飾も含め、期待される全てのことが実際に起こっていることがわかった。

GroEの減少により熱ショック蛋白質の合成速度が増加する GroEの減少により合成速度が増加する#3と#4の蛋白質は位置からHtpGとDnaKと予想された。野生株(MC4100)を30℃から42℃に移して³⁵S-メチオニンで標識することにより、それらが熱ショック蛋白質であることを確認した。またdnaK欠失株では#4の蛋白質がゲル上に現われないことも確認した。加えてこれらの実験は#2と#7の蛋白質も熱ショック蛋白質であることを示唆した。位置からそれらはClpBとHtpIと思われる。我々の実験系で同定できる全ての熱ショック蛋白質の合成速度がGroEの減少により増加していたので、一群の熱ショック蛋白質の合成速度が増加しているものと結論した。

代表としてDnaKの合成速度を³⁵S-メチオニンで標識後、抗体沈殿により定量した(図9)。GroEが野生株の25%まで減少するIPTG非存在下でDnaKの合成速度が2-3倍増加していた。IPTGの濃度が高くなるにつれて、野生株の合成速度に近づいていった。一群の熱ショック蛋白質の合成速度が増加していたので、 σ^{32} を介した増加であることが期待された。

σ^{32} の安定化と合成速度の上昇による量の増加が熱ショック蛋白質の合成速度を増加させる σ^{32} をウエスタンブロッティングにより定量すると、GroEが減少するのに伴い増加していることがわかった(図9)。GroEが野

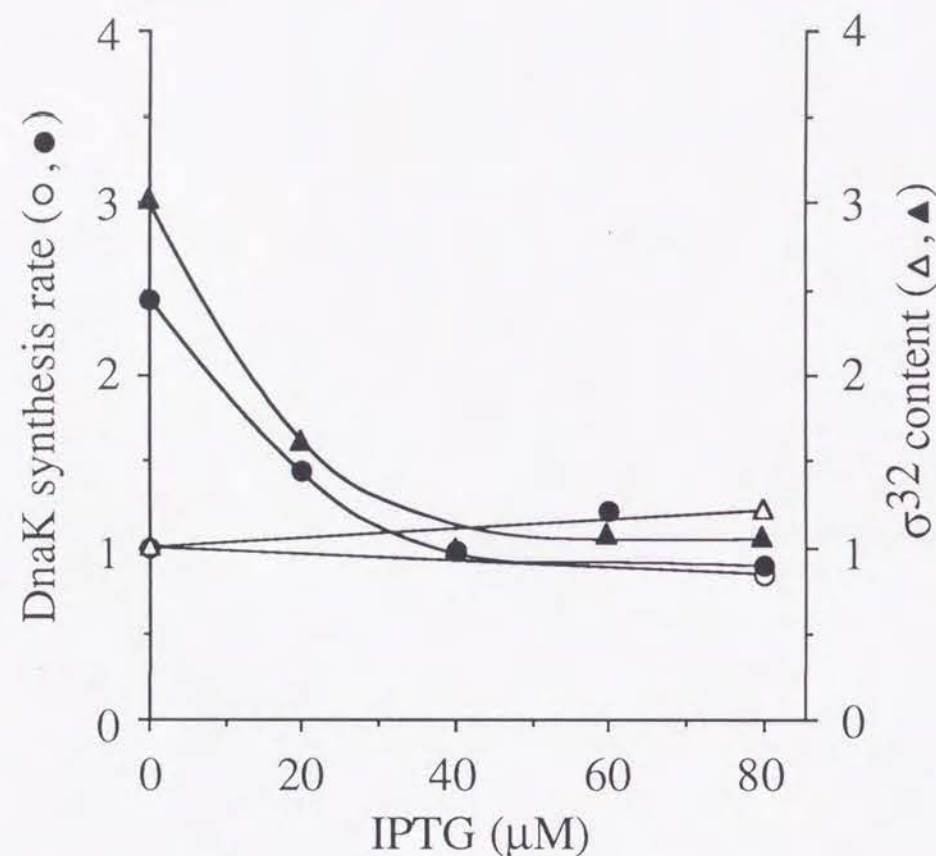


図 9、GroEの減少に伴うDnaKの合成速度と σ^{32} の量の変化

37℃、示した濃度のIPTGを含む合成培地で菌を増殖させ、100 μ Ci/mlの 35 S-メチオニンで2分間標識した。抗体沈殿によりDnaKの合成速度を定量した(○、●)。同じ条件で増殖させた菌の σ^{32} 含量をウェスタンブロットティングにより定量した(Δ、▲)。それぞれIPTG非存在下で増殖させた野生株の合成速度もしくは含量を1とし、2回(DnaK合成速度)ないし3回(σ^{32} 含量)の実験の平均を示す。○とΔ、野生株(MC4100)；●と▲、KY1880

生株の25%まで減少すると σ^{32} は約3倍増加していた。さらにパルス-チェイス実験により σ^{32} の安定性を調べてみると、GroEが25%まで減少すると約2倍安定化していることがわかった(図10、A)。一方 σ^{32} の合成速度を調べると、GroEの減少に伴い約1.5倍上昇していることが観察された(図10、B)。rpoHとlacZ遺伝子の融合オペロンを持つ λ ファージ(λ OF-0)の溶原菌を用いて、この融合オペロンにコードされている β -ガラクトシダーゼの合成速度を調べた。この実験では培地に加えたIPTGの濃度はこれまでの実験の10分の1とした。これは理由はわからないが、 λ の溶原菌ではLacIリプレッサーによるlacUV5プロモーターの抑制が弱くなるためである。GroE減少により β -ガラクトシダーゼの合成速度が約1.5倍増加していたので(図11)、 σ^{32} の合成速度の増加は転写段階での増加であることがわかった。すなわち σ^{32} の増加は安定化と転写段階での合成速度の上昇の両方に起因していることがわかった。

GroEの減少に伴い量が増加する蛋白質の同定 GroEの減少に伴い量が増加する13個の蛋白質の中で、比較的量が多くて他の蛋白質から分離して

いる3個のものの同定を試みた。2次元電気泳動により分離した蛋白質をメンブレン上に移し、染色後目的とする蛋白質のスポットを切り出し、自動蛋白質シーケンサーで解析を行った。得られた結果をGenBankデータベースに登録されている既知の蛋白質のアミノ酸配列と比較した。その結果、#1は6-ホスホグルコン酸デヒドラターゼ(edd遺伝子産物)と#10は2-ケト-3-デオキシ-ホスホグルコン酸アルドラーゼ(eda遺伝子産物)とそれ

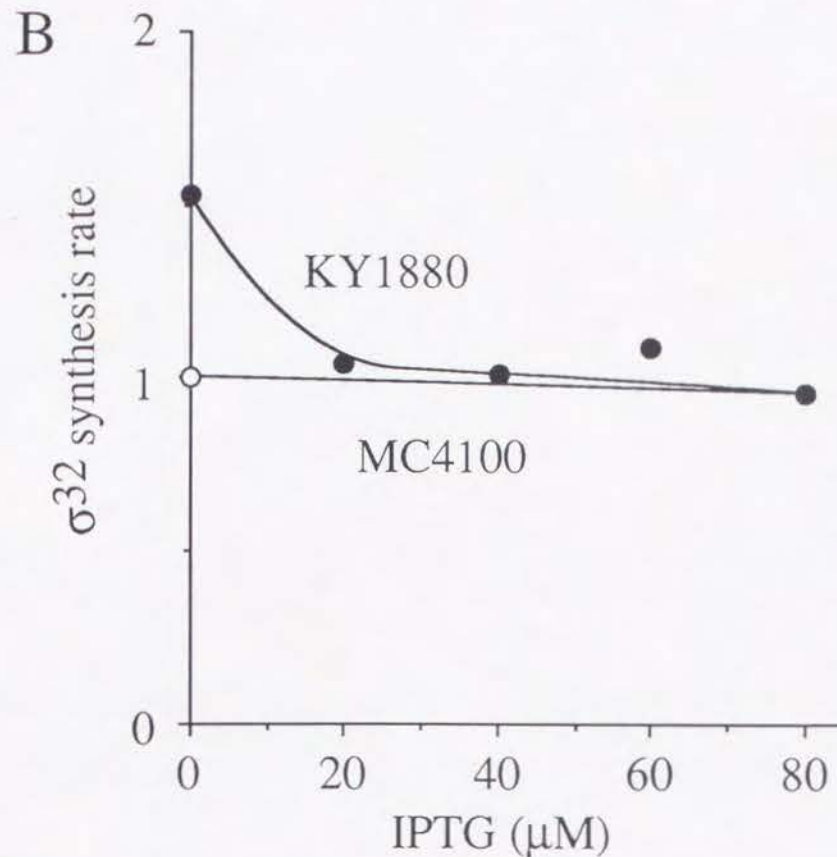
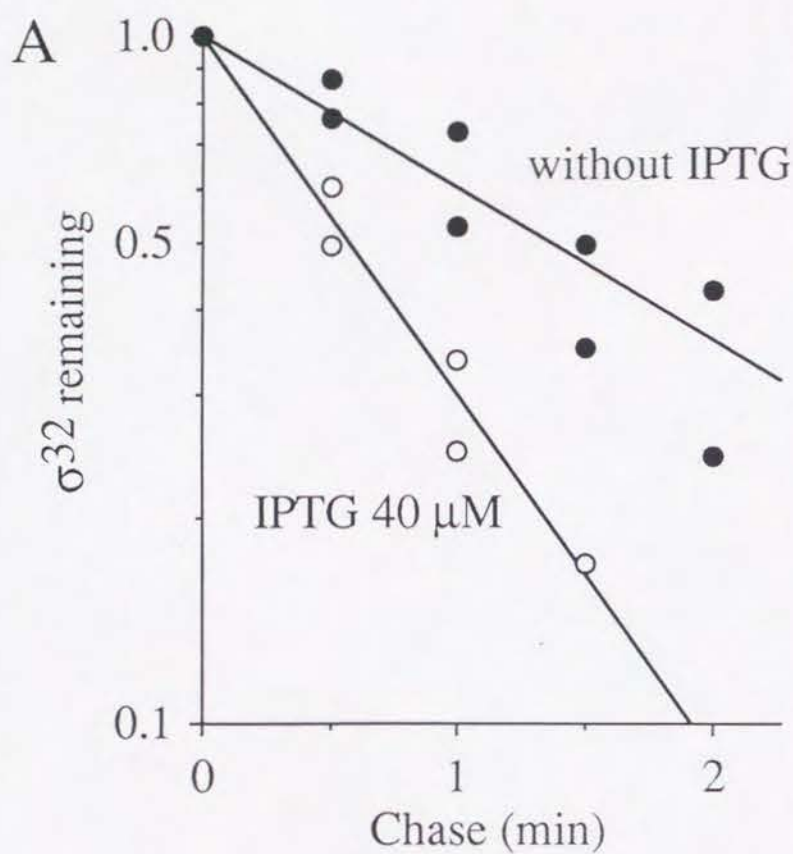


図10、GroE減少に伴う σ^{32} の安定性と合成速度の変化

A、37℃、合成培地でKY1880株をIPTG存在下（40 μM）、非存在下で増殖させ、100 μCi/mlの³⁵S-メチオニンで30秒間標識した。大量の非放射性メチオニン（200 μg/ml）を加えて30秒後を0 timeとして30秒間隔で菌を分取し、抗体沈殿により σ^{32} の安定性を調べた。0 timeを1として³⁵S-メチオニンを取り込んだ σ^{32} の残量をプロットした。○、IPTG 40 μM；●、IPTGなし

B、37℃、示した濃度のIPTGを含む合成培地で菌を増殖させ、100 μCi/mlの³⁵S-メチオニンで30秒間標識した。抗体沈殿により σ^{32} の合成速度を定量した。IPTG非存在下で増殖させた野生株(MC4100)の合成速度を1とし、2回の実験の平均を示した。○、野生株(MC4100)；●、KY1880

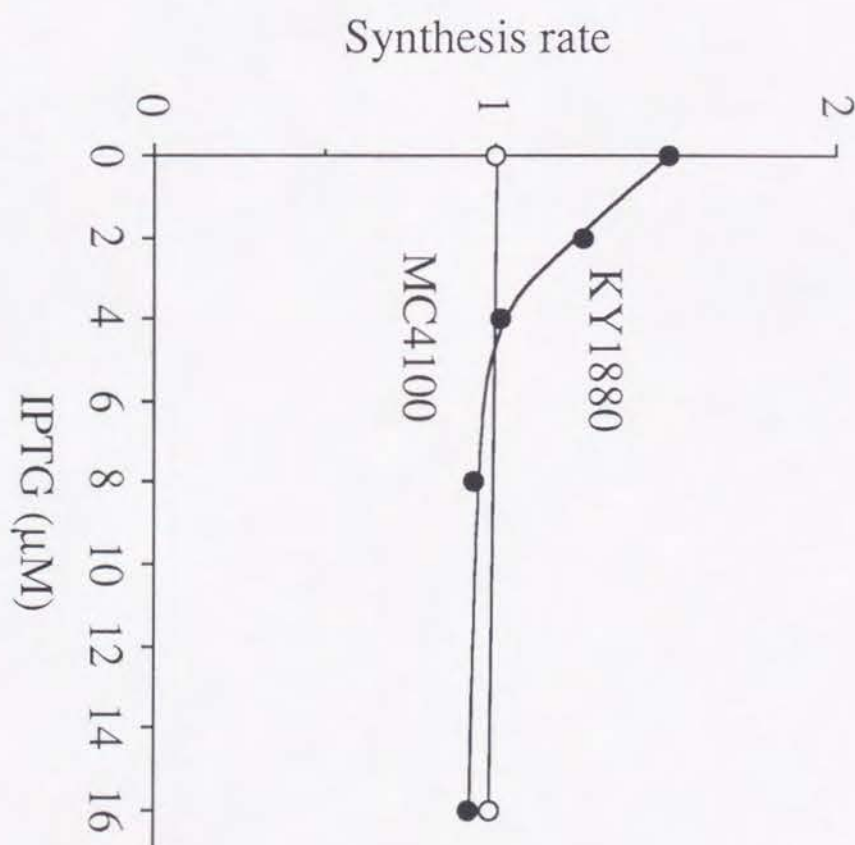


図11、GroE減少に伴う *rhoH-lacZ* 融合オペロンの発現の変化

37℃、示した濃度でIPTGを含む合成培地で λ OF-0溶原菌を増殖させ、100 μCi/mlの³⁵S-メチオニンで1分間標識した。抗体沈殿により融合オペロンから発現、合成されるβ-ガラクトシダーゼの合成速度を定量した。○、野生株(MC4100)；●、KY1880

ぞれN末から8個もしくは30個のアミノ酸配列が完全に一致した。これら2つの蛋白質をコードする遺伝子、*edd*と*eda*はオペロンを形成しており、グルコン酸により発現が誘導される。私は野生株(MC4100)においてグルコン酸により#1と#10の蛋白質が誘導されることを確認した。

一方#11の蛋白質はリボソーム蛋白質S6 (*rpsF*遺伝子産物) とN末の28アミノ酸が完全に一致した。このS6蛋白質は翻訳後にC末にグルタミン酸が数個付加されることがわかっている(Reeh et al., 1979; Schnier et al., 1986)。今回の実験において翻訳後の修飾を受けると考えられる#12と#13の蛋白質は#11の蛋白質より酸性側に現われ、かつ分子量もわずかに増加していることから、修飾を受けたS6蛋白質の可能性が高い。すなわちGroEの減少によりS6蛋白質の翻訳後の修飾が阻害されていることが示唆される。

表2に今回の実験でGroEの減少により量が変わることが明かとなった13個の蛋白質の特徴をまとめた。

表2、GroEの減少により影響を受ける蛋白質

番号	蛋白質名	観察された影響
1	6-ホスホグルコン酸デヒドラターゼ	合成速度の増加
2	熱ショック蛋白質ClpB	合成速度の増加
3	熱ショック蛋白質HtpG	合成速度の増加
4	熱ショック蛋白質DnaK	合成速度の増加
5	未知	不安定化
6	未知	合成速度の増加
7	熱ショック蛋白質HtpI	合成速度の増加
8	未知	合成速度の減少
9	未知	合成速度の減少
10	2-ケト-3-デオキシ-ホスホグルコン酸アルドラーゼ	合成速度の増加
11	リボソーム蛋白質S 6	翻訳後の修飾阻害
12	リボソーム蛋白質S 6	
13	リボソーム蛋白質S 6	

考 察

本研究においてシャペロン機能を持つGroEの細胞内含量を特異的に調節できる系を開発した。この系を用いてGroEを野生株の25 %まで減少させると、37℃以下では生育可能なのに対し42℃では増殖できないことがわかった。このことは明らかに増殖温度が高くなるにつれてより多くのGroEを必要とすることを示している。今回の実験により37℃における定常状態でのGroEの減少が少なくとも13個の蛋白質の合成速度、安定性、合成後の修飾に影響を及ぼすことが明らかとなった。

最近、Horwichらにより*groE*遺伝子の熱感受性変異株を用いてGroEが細胞内の多くの蛋白質の折畳みに関与していることを示唆する結果が報告された(Horwich et al., 1993)。すなわち非許容温度で、合成は正常であるが最終的な構造をうまくとれない蛋白質がたくさん存在することが報告された。合成速度が変化するようなものも含めていくつかの蛋白質が同定されたが、それらと今回の13個の蛋白質は一致していない。その理由は変異を持つGroEを用いた非許容温度下での実験と、定常状態で正常なGroEの量を減少させるという実験条件の差によると思われる。私が今回の実験で特に注目した熱ショック蛋白質の合成速度の増加も彼らの系では検出されなかった。実験条件によりGroEを折り畳みに必要とする蛋白質が変わることが考えられる。

GroE減少により σ^{32} が安定化する機構 GroEの減少により合成速度が増

加する蛋白質の中に一群の熱ショック蛋白質が含まれており、熱ショック蛋白質の合成速度の増加は σ^{32} の安定化と合成速度の上昇による量の増加が原因となっていることがわかった。GroEの減少に伴い σ^{32} の安定化が起こる機構としては以下の3つのことが考えられる。

まず定常状態ではGroEが σ^{32} と結合することで分解を促進しているが、GroEが減少して σ^{32} と結合できなくなると、GroEと結合していない σ^{32} は安定になるという可能性である。これまでに σ^{32} の素早い分解に必要とされる蛋白質として熱ショック蛋白質であるDnaK、DnaJ、GrpEがわかっている。これらをコードする遺伝子の変異により σ^{32} が非常に安定化されることや(Straus et al., 1990)、細胞内でこれらの蛋白質が σ^{32} と結合していることが示された(Gamer et al., 1992)。しかし、これら自身に蛋白質分解能があることは知られていない。また精製した蛋白質を用いた実験でもDnaKは σ^{32} と直接結合する(Liberek et al., 1992)。けれどもいままでに採られた*groE*変異株の中で σ^{32} が安定化することは報告されていないし、 σ^{32} とDnaKが結合するin vitroの実験条件で σ^{32} とGroEは結合しない(Liberek et al., 1992)。これらのことを考え合わせると細胞内で σ^{32} とGroEが結合しているという可能性は低い。

2番目はGroEが σ^{32} を分解する酵素の折畳みに必要とされ、GroEが減少すると分解酵素の折り畳みが異常になって活性が落ち、 σ^{32} が安定化されるという可能性である。 σ^{32} を分解する酵素はまだ同定されていないが、GroEの働きを考えると可能性は高い。

3番目の可能性はGroEが減少すると細胞内に折畳みのうまくいかなくなっ

た蛋白質が蓄積し、それらにより熱ショック蛋白質の合成が誘導されるというものである。折り畳みが正常に進まない変異蛋白質を合成させたり、アミノ酸アナログを取り込ませたりして異常蛋白質が細胞内に蓄積すると、熱ショック蛋白質の合成が誘導されることがわかっている(Goff et al., 1985; Parsell et al., 1989)のでこの可能性は十分あり得る。しかし上述したようにHorwichらの実験では細胞内に異常蛋白質が蓄積しているにも関わらず、熱ショック蛋白質の合成速度は増加しなかった(Horwich et al., 1993)。このことを考えると2番目の可能性が強くなるが、異常蛋白質の蓄積量や性質が熱ショック蛋白質の合成誘導に関わってくることも十分考えられるので、今回みられた σ^{32} の安定化が異常蛋白質を介した2次的なものであるという3番目の可能性は否定されるものではない。

最近分泌蛋白質の分泌がうまくいかない*secB*遺伝子破壊株において熱ショック蛋白質の合成速度が上昇していることが報告された(Wild et al., 1993)。この場合にも安定化による σ^{32} の量の増加が観察されている。SecB蛋白質は細胞質内で分泌蛋白質特異的なシャペロンとして働いている。細胞質内に蓄積した分泌蛋白質の前駆体が細胞に異常蛋白質として認識されると考えると、3番目の可能性を支持する。

GroE減少により σ^{32} の合成速度が増加する機構 GroEの減少に伴う σ^{32} の合成速度の上昇は*rpoH*と*lacZ*遺伝子の融合オペロンを用いた実験から転写段階での増加であることがわかった。通常の30℃から42℃への温度シフトに伴う σ^{32} の合成誘導は翻訳段階で起こるので、それとは異なる現象をみて

いることになる。まだ予備実験の段階だが、4種類のmRNAの量をS1マッピングにより調べると、特定のプロモーターからの転写産物が増加しているのではないことがわかった(未発表データ)。4つのプロモーターからの発現は異なる調節を受けているので、この結果からmRNAの合成速度の増加というよりもmRNAが安定化していることが示唆される。本論文の第2部で示すように異常蛋白質の合成では σ^{32} の合成速度の増加は転写、翻訳どちらの段階でも起こらないので、今回の結果はGroEが何か特定の蛋白質に働きかけることができなくなったためと思われる。このような蛋白質の候補としては、RNaseEが考えられる。RNaseEは大腸菌においてmRNAの分解に関与している酵素である。最近*groE*変異株ではRNaseEの活性が弱くなること、RNaseEとGroEが少なくとも精製段階で結合していることが報告された(Sohlberg et al., 1993)。*rpoH* mRNAはRNaseEにより分解されているのかもしれない。このことは今後RNaseEをコードする遺伝子の変異株を用いて解析すべき課題である。

GroE減少に伴い熱ショック蛋白質以外で量が増加する蛋白質 GroEの減少により合成速度が増加している#1と#10の蛋白質は*edd-eda*オペロンの遺伝子産物であった。これらの遺伝子はグルコース分解経路の1つであるエントナー-ドッドロフ経路(ED経路)の2つの酵素をコードしている(Egan et al., 1992)。このオペロンの発現はグルコン酸により誘導され、普段はリプレッサーにより抑制されていることが示唆されている。GroEはこのリプレッサー蛋白質の正常な折り畳みに必要とされる可能性がある。もし

くはグルコース代謝の主経路であるエムデン-マイヤーホフ経路 (EM経路) もしくはペントースリン酸経路の酵素がGroEの減少により活性が落ちて、基質がED経路の方に流れてくるためにedd-edaオペロンの抑制がはずれると考えることもできる。3つの経路の関係を図12に簡単に示した。ピルビン酸以降の代謝産物を炭素源として菌を増殖させたときにedd-edaオペロンの発現がどうなるかをみることで上述した2つの可能性を区別できると思われる。

さらに#11はリボソーム蛋白質S6であった。この蛋白質は翻訳後にC末にグルタミン酸が数個付加される(Reeh et al., 1979; Schnier et al., 1986)。恐らくスポットの位置から見て#12と#13の蛋白質が修飾を受けたS6蛋白質と思われる。GroEの減少により修飾が遅れるを示している。S6蛋白質はリボソームの会合途中もしくはリボソームの中に取り込まれてから修飾されることが示唆されており(Reeh et al., 1979; Kitakawa et al., 1980)、GroEがリボソームの会合に関与している可能性がある。また修飾に関与している蛋白質が細胞内で正常に折り畳まれるためにGroEを必要としていることも考えられる。

今後の課題 本研究では正常な折り畳みにGroEを必要とする蛋白質を同定することができなかった。edd-edaオペロンの発現増加とリボソーム蛋白質S6の修飾の遅れは上述した可能性を調べる実験を行わなければならない。熱ショック蛋白質の合成速度の増加に関しても、 σ^{32} の増加の機構をはっきりと示すことができなかった。 σ^{32} の安定化は約2倍、合成速度の増加は

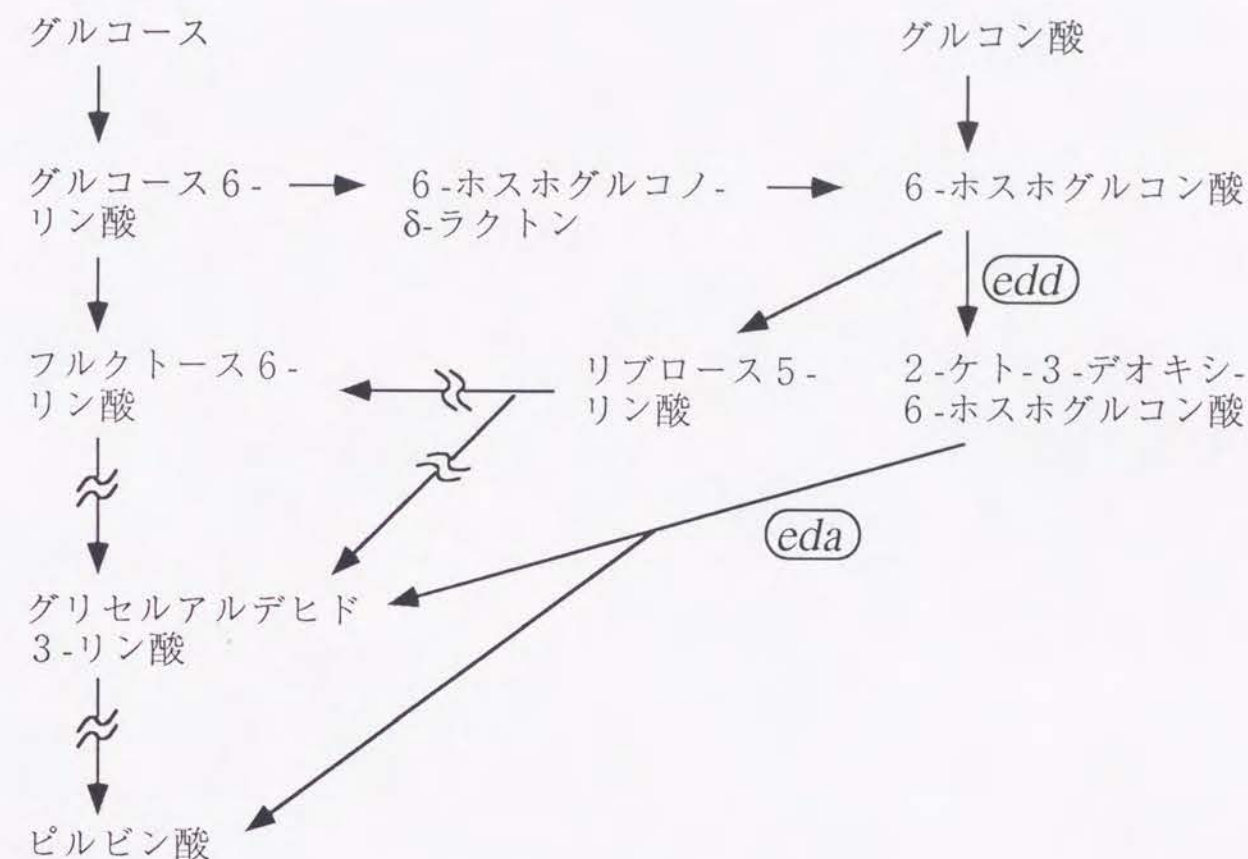


図12、グルコース代謝経路

エムデン-マイヤーホフ経路、ペントースリン酸経路、エントナー-ドッドロフ経路の関連部分を示した。エントナー-ドッドロフ経路の2つの酵素を必要とするステップを遺伝子名で示した。

1.5倍程度と影響が弱く、例えば*rpoH* mRNA量をS1マッピングにより定量したが、実験結果の評価が難しかった。もっとGroEを減少させると影響が強く現れることが考えられる。今回使った*groE*発現ベクターは多コピープラスミドだったためにGroEを野生株の25 %より大幅に減少させることができなかった。私は最近発現ベクターのコピー数を1にすることを試み、成功した。この条件では培地中からIPTGを除くと菌の増殖は数回分裂した後に止まり、GroEがかなり減少していることが期待される。この系を使って同様の実験を開始するところである。

さらにこの系を使うと、今回の13個の蛋白質に加えて影響を受ける蛋白質の数がさらに増加することも期待される。Horwichらは上述した彼らの結果に加えて、非許容温度下でGroEが失活しても少なくとも一部の蛋白質は正常に折り畳まれることも報告し(Horwich et al., 1993)、GroEがすべての蛋白質の正常な折り畳みに必要とされるのではないことも示した。私は本研究を継続することによりGroEを必要とする蛋白質と必要としない蛋白質を分類して、2つのグループの特徴を見出したいと思っている。

第2部

異常蛋白質の蓄積に伴う熱ショック蛋白質の合成誘導

結 果

アゼチジンカルボン酸による熱ショック蛋白質の合成誘導は σ^{32} に依存する。プロリンアナログであるアゼチジンカルボン酸を4 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で30℃で対数増殖期の野生株(MC4100)に加えると、何も加えなかったコントロールもしくはプロリンを加えたコントロールと比較して増殖速度がわずかに悪くなる。菌の増殖を濁度(吸光度 A_{600})で調べるとアゼチジンカルボン酸添加前のダブリングタイムは約70分だが、添加後は徐々に増殖が悪くなった(図13)。アゼチジンカルボン酸添加後の蛋白質の合成速度の変化を調べるために10分間隔で細胞を ^{35}S -メチオニンで標識し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。時間が経つに連れて熱ショック蛋白質であるDnaKやGroELの合成速度が増加しているのが観察された(図14、A)。合成速度の増加はアゼチジンカルボン酸添加後すでに10分で観察され、ピークに達した後、緩やかに減少した。DnaKとGroELの合成速度を抗体沈殿により測定すると、アゼチジンカルボン酸添加後ほとんど遅延なく増加し始め、30-50分でピークに達し、その後緩やかに減少した(図14、B)。プロリンもしくはプロリンとアゼチジンカルボン酸を同時に加えたコントロールではこのような合成速度の増加は全く観察されなかった(図14、B)、アゼチジンカルボン酸は確かにプロリンのアナログとして作用していると思われる。

これまでに報告された熱ショック蛋白質の合成誘導には σ^{32} が必要とされ

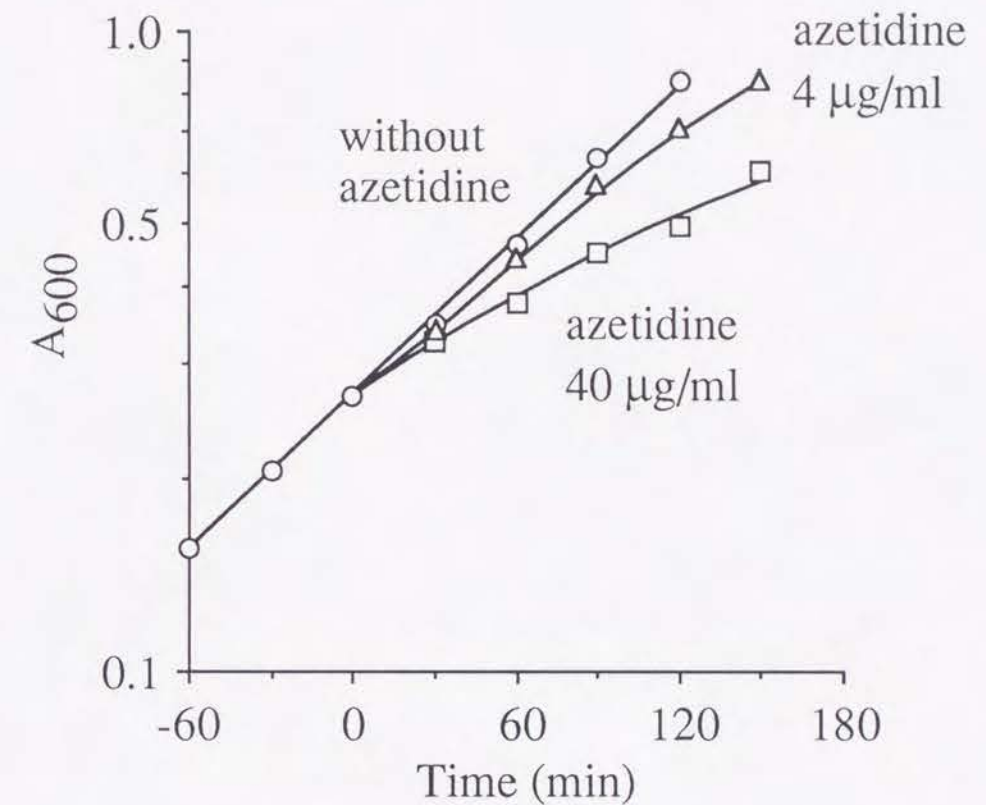


図13、アゼチジンカルボン酸添加後の増殖

30℃、合成培地で対数増殖期の野生株(MC4100)に示した濃度になるようにアゼチジンカルボン酸を添加した(0 time)。30分間隔で吸光度(A_{600})を測定した。○、アゼチジンカルボン酸なし；△、アゼチジンカルボン酸4 $\mu\text{g/ml}$ ；□、アゼチジンカルボン酸40 $\mu\text{g/ml}$

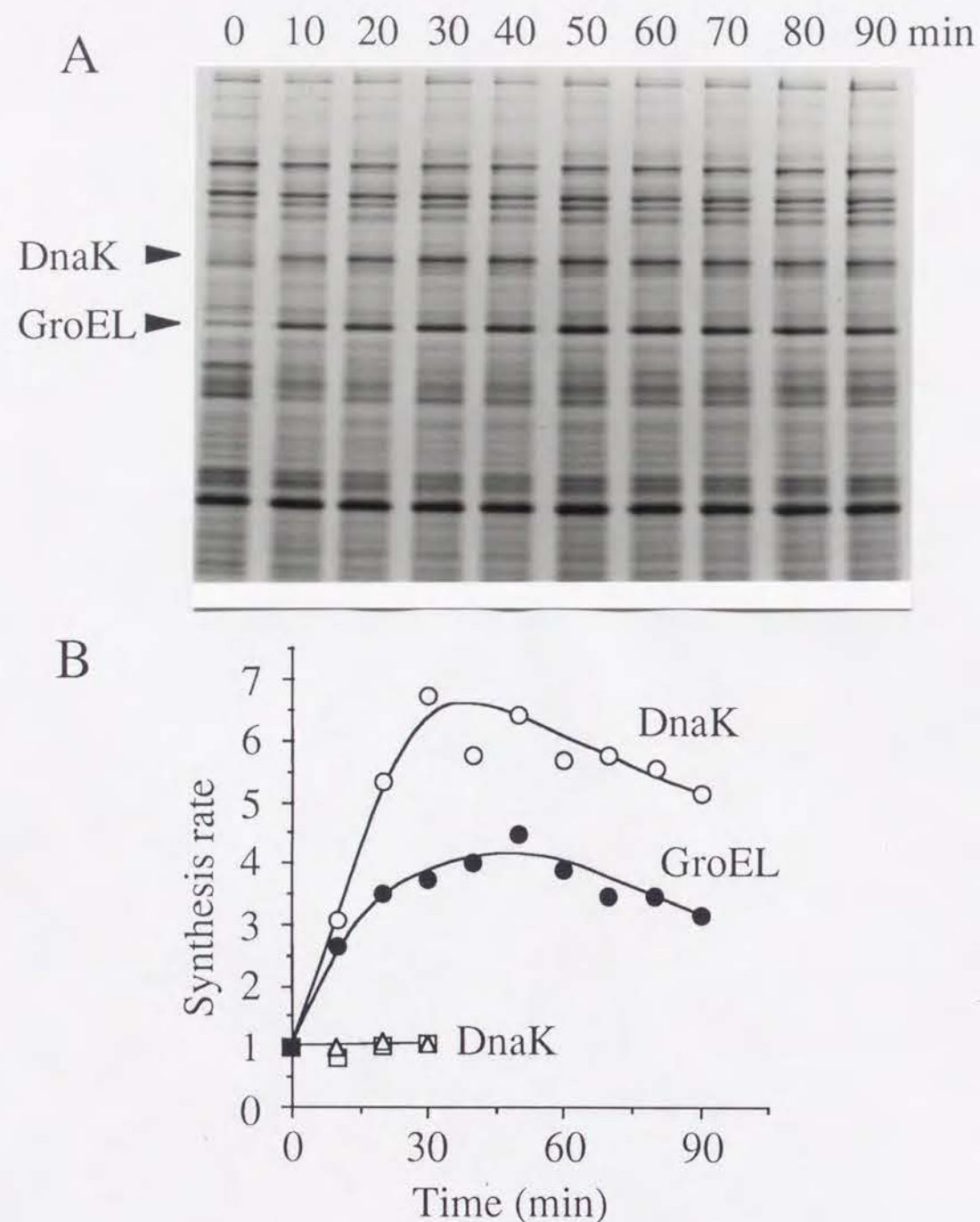


図14、培地へのアゼチジンカルボン酸添加による熱ショック蛋白質の合成誘導

30℃、合成培地で対数増殖期の野生株(MC4100)に4 µg/mlとなるようにアゼチジンカルボン酸を添加し、10分間隔で100 µCi/mlの³⁵S-メチオニンで2分間標識した。

A、全蛋白質を泳動したゲルのオートラジオグラフを示す。アゼチジンカルボン酸を添加してからの時間を上に示す。

B、DnaK (○) とGroEL (●) の合成速度を抗体沈殿により定量した。アゼチジンカルボン酸を添加する前(0 time)の合成速度を1とし、2回の実験の平均を示した。

また△はプロリン(4 µg/ml)を加えたコントロールで□はプロリン(4 µg/ml)とアゼチジンカルボン酸(4 µg/ml)を同時に加えた時のDnaKの合成速度を示す。

ることがわかっているが、アゼチジンカルボン酸による熱ショック蛋白質の合成誘導も σ^{32} を必要とするのかどうかを調べるために、 σ^{32} をコードする *rpoH* 遺伝子欠失株(KY1700)で同様の実験を行った。*rpoH* 欠失株は20℃より高温で増殖できないので実験は18℃で行った。18℃での野生株(MC4100)の増殖速度は30℃と比較して約4倍長くなり、*rpoH* 欠失株では野生株のさらに約2倍長くなるので、アゼチジンカルボン酸を添加してから3時間後まで観察した。また抗体沈殿による合成速度の測定は σ^{32} 非依存性のプロモーターも合わせ持ち、*rpoH* 欠失株中でも少量ながら合成されているGroELを対象とした(図15)。野生株ではアゼチジンカルボン酸添加後、30分で既にGroELの合成速度の増加がみられるが、*rpoH* 欠失株では3時間後でも増加は観察されなかった。このことはアゼチジンカルボン酸による熱ショック蛋白質の合成誘導も σ^{32} を必要とすることを示しており、これまでの報告と一致する。

異常蛋白質合成による熱ショック蛋白質の合成誘導は σ^{32} の量の増加による
熱ショック応答は σ^{32} の量の変動により調節されている。アゼチジンカルボン酸による熱ショック蛋白質の合成誘導も σ^{32} の量の変動により調節されているかどうかを調べた。ウエスタンブロッティングにより σ^{32} の量を調べると、アゼチジンカルボン酸を添加して3分後に既に増加し始めており、少なくとも30-40分まで増え続けることがわかった(図16)。同じ時間間隔で抗体沈殿によりDnaKの合成速度を調べると、合成速度の増加と σ^{32} の増加がよく一致していることがわかった(図16)。このことは上述の結果

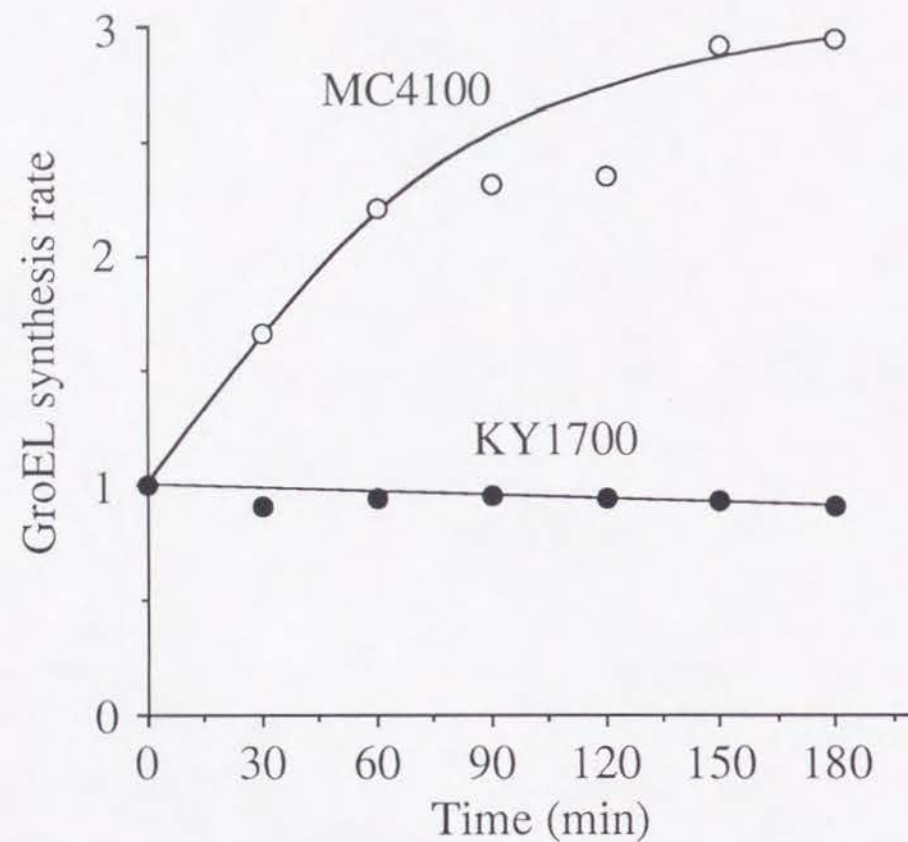


図15、*rpoH*欠失株(KY1700)のアゼチジンカルボン酸に対する応答

18 °C、メチオニン、システイン、プロリンを除く17アミノ酸（各20 µg/ml）を含む合成培地で対数増殖期の細胞に20 µg/mlとなるようにアゼチジンカルボン酸を加えた。30分間隔で100 µCi/mlの³⁵S-メチオニンで2分間標識した。GroELの合成速度を抗体沈殿により定量した。アゼチジンカルボン酸添加前(0 time)の合成速度を1とし、2回の実験の平均を示した。
○、野生株(MC4100)；●、*rpoH*欠失株(KY1700)

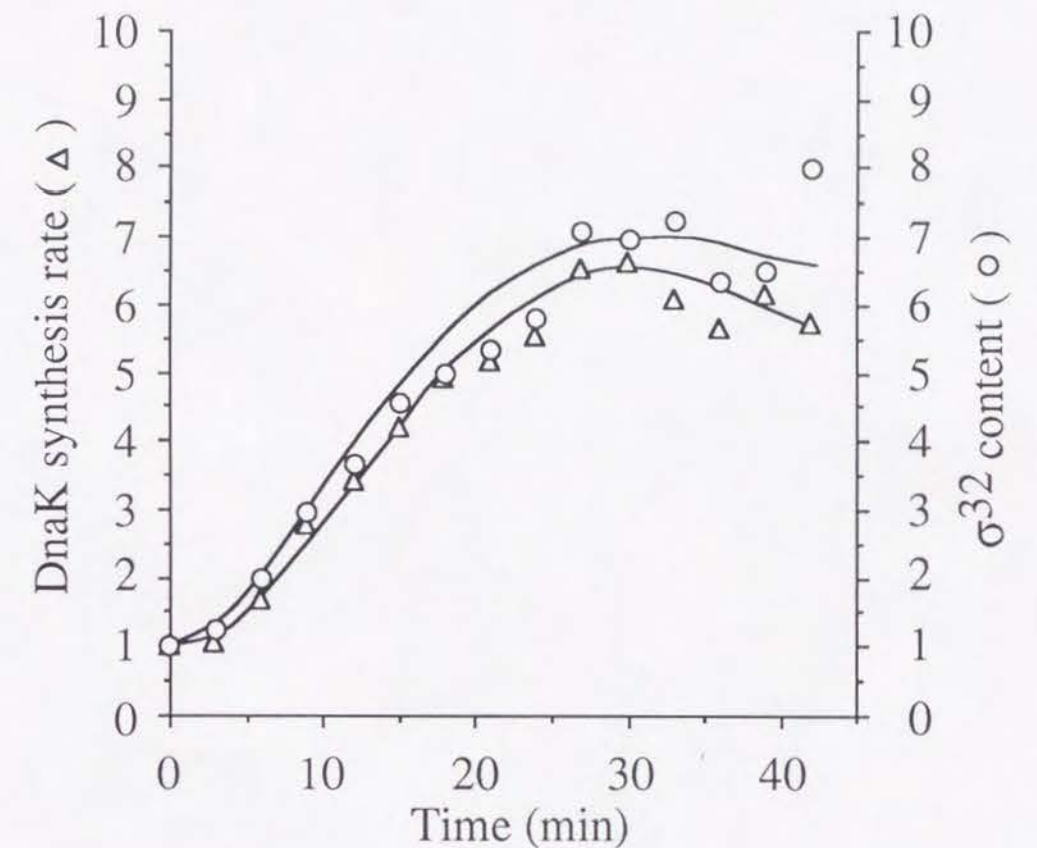


図16、アゼチジンカルボン酸添加による σ^{32} の増加

30 °C、合成培地で対数増殖期の野生株(MC4100)に4 µg/mlとなるようにアゼチジンカルボン酸を加えた。3分間隔で100 µCi/mlの³⁵S-メチオニンで2分間標識した。DnaKの合成速度 (Δ) を抗体沈殿により定量した。アゼチジンカルボン酸添加前(0 time)を1とし、2回の実験の平均を示した。同じ条件で増殖させた菌をアゼチジンカルボン酸添加後3分間隔で分取し、 σ^{32} (○) をウエスタンブロッティングにより定量した。アゼチジンカルボン酸添加前(0 time)を1とし、3回の実験の平均を示した。

と合わせて、熱ショック蛋白質の合成誘導は σ^{32} の増加に伴って起こることを示している。

アゼチジンカルボン酸を培地に添加するとプロリンの代わりに蛋白質の中に取り込まれて多くの蛋白質の変性が起こると考えられる。熱ショック応答を調節している蛋白質の変性も起こるので、上述した結果が異常蛋白質の合成、蓄積というよりも特異的な蛋白質の変性による結果である可能性がでてくる。私はこのような可能性を排除するために上記の実験のほかにヒトのプロウロキナーゼを大腸菌の中で合成させて、異種蛋白質による熱ショック蛋白質の合成誘導の機構も平行して調べることにした。培地中のIPTGにより制御可能な*tac*プロモーター下流にヒトのプロウロキナーゼ遺伝子を持つプラスミド(pUK-02pmO)を野生株(MC4100)に取り込ませ、形質転換を行った。培地に100 μ MとなるようにIPTGを加えた後、10分間隔で菌を 35 S-メチオニンで標識した。抗体沈殿によりプロウロキナーゼの合成速度の変化を調べると、添加後10分で既に合成速度が最大となっており、少なくとも90分後まではその状態が続いた（未発表データ）。ウエスタンブロッティングによりその蓄積量を調べると、添加直後から増え始めて少なくとも60分後までは増え続けることがわかった（未発表データ）。しかし、その蓄積量は全体の蛋白質と比べると少なく、全蛋白質を泳動してコマジーブリリアントブルー染色後にバンドとして観察できるところまではこの条件では蓄積しなかった。

IPTG添加後15分間隔で菌を 35 S-メチオニンで標識し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。アゼチジンカルボン酸を加えた時と同様に

DnaKとGroELの合成速度がIPTG添加直後から増加しているのが観察された（図17、A）。抗体沈殿によりDnaKとGroELの合成速度を測定すると、添加後15分で既に数倍増加しており、1時間後にピークに達することがわかった（図17、B）。 σ^{32} の量をウエスタンブロッティングにより測定すると、IPTG添加直後から増加がみられ、DnaKの合成速度の増加とよく一致していた（図18）。これらのことからプロウロキナーゼの合成による熱ショック蛋白質の合成誘導もアゼチジンカルボン酸添加時と同様に σ^{32} の増加に伴って起こることがわかった。

異常蛋白質合成による σ^{32} の安定化 上述した σ^{32} の増加がこの非常に不安定な蛋白質の安定化によるのかどうかを調べた。アゼチジンカルボン酸を添加して熱ショック蛋白質の合成速度がピークに近くなる30分後に菌を 35 S-メチオニンで標識し、大量の非放射性メチオニンを加えてから一定の時間間隔で分取した。抗体沈殿により 35 S-メチオニンを取り込んだ σ^{32} の残量を測定した。プロリンを加えたコントロールでは半減期約1分と素早く分解されるのに対し、アゼチジンカルボン酸を加えたほうでは半減期が8分以上になっていた（図19、A）。プロウロキナーゼを合成させた場合にも同様に σ^{32} の安定化が起こっていることがわかった。IPTGを添加して30分後に σ^{32} の分解を調べると、何も加えないコントロールでは半減期が約1.5分であるのに対し、IPTGを加えたほうではチェイス8分ではほとんど分解されなかった（図19、B）。これらのことは異常蛋白質の合成に伴い σ^{32} が非常に安定化されていることを示している。その安定化の程度は σ^{32} の増加を十分

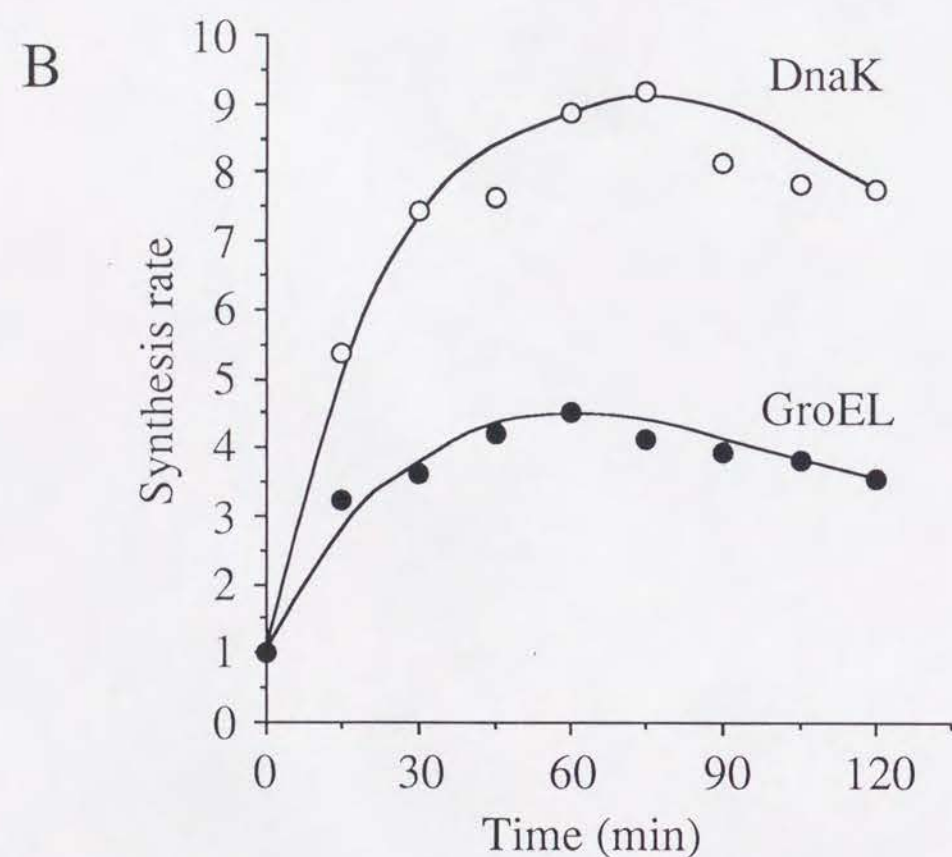
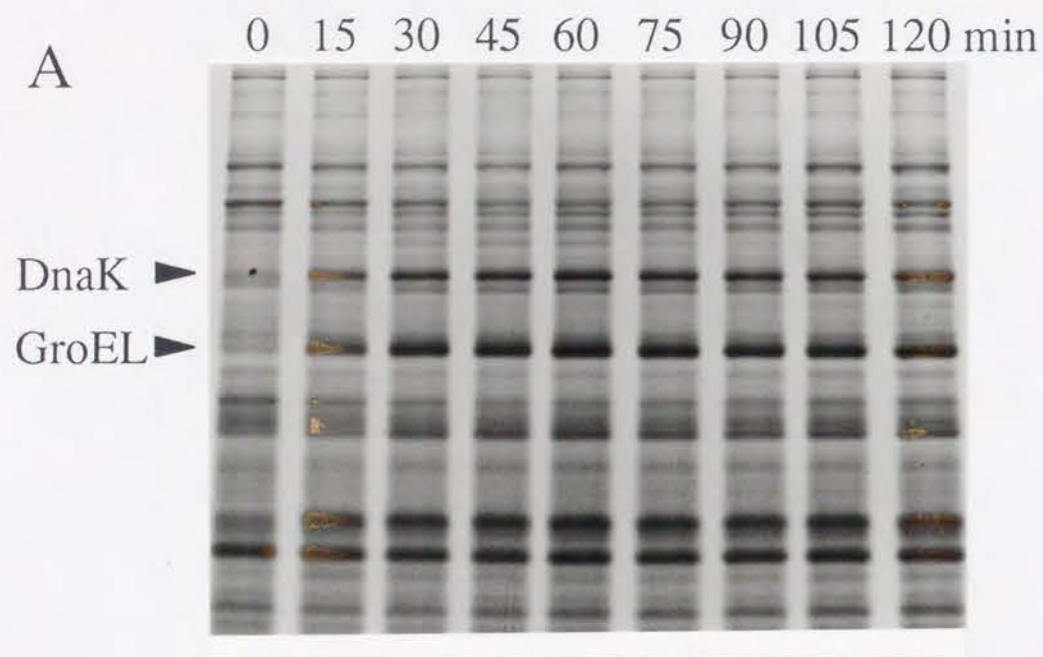


図17、異種蛋白質（ヒトのプロウロキナーゼ）の合成による熱ショック蛋白質の合成誘導

30 °C、合成培地で対数増殖期の細胞（pUK-02pmOを持つ野生株(MC4100)）に100 μ MとなるようにIPTGを加えて、プロウロキナーゼの合成を誘導した。IPTG添加後15分間隔で100 μ Ci/mlの 35 S-メチオニンで2分間標識した。A、全蛋白質を泳動したゲルのオートラジオグラフを示す。IPTGを添加してからの時間を上に示す。

B、DnaK (○) とGroEL (●) の合成速度を抗体沈殿により定量した。IPTGを添加する前(0 time)を1とし、2回の実験の平均を示した。

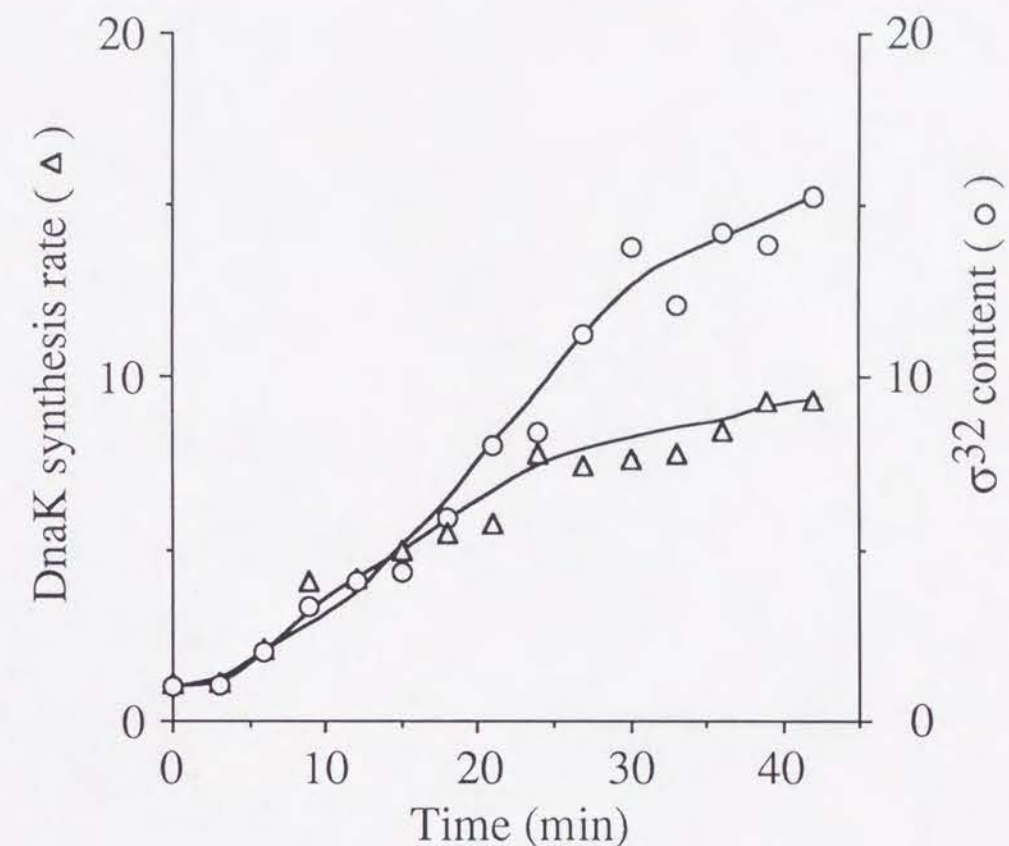


図18、プロウロキナーゼ合成に伴う σ^{32} の増加

30 °C、合成培地で対数増殖期の細胞（pUK-02pmOを持つ野生株(MC4100)）に100 μ MとなるようにIPTGを加えて、プロウロキナーゼの合成を誘導した。IPTG添加後3分間隔で100 μ Ci/mlの 35 S-メチオニンで2分間標識した。DnaKの合成速度 (Δ) を抗体沈殿により定量した。IPTG添加前(0 time)を1とし、2回の実験の平均を示した。同じ条件で増殖させた菌をIPTG添加後3分間隔で分取し、 σ^{32} (○) をウエスタンブロッティングにより定量した。IPTG添加前(0 time)を1とし、2回の実験の平均を示した。

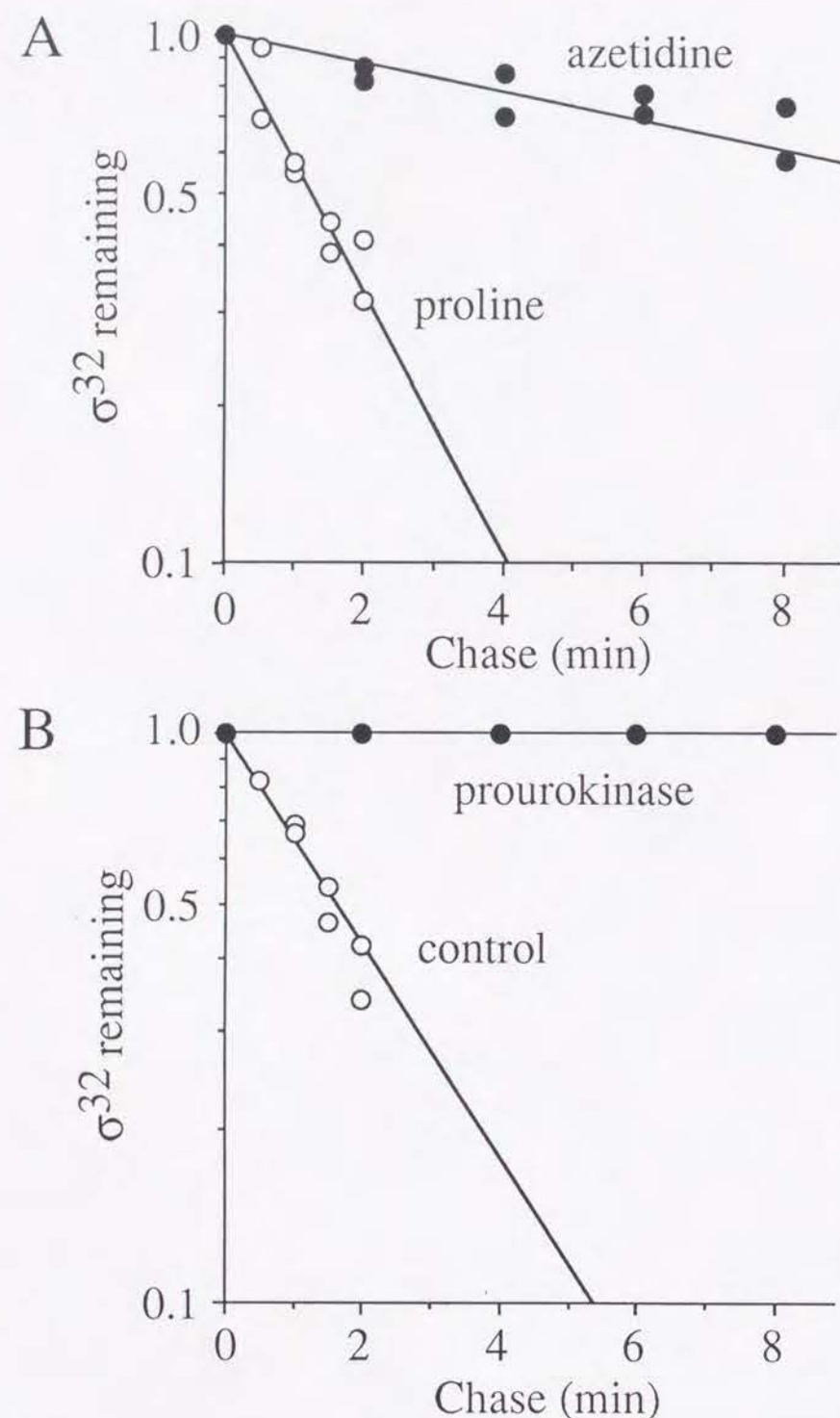


図19、異常蛋白質合成に伴う σ^{32} の安定性の変化

30℃、合成培地で対数増殖期の細胞に図14、図17で示したように異常蛋白質を合成させ、30分後に100 μ Ci/mlの 35 S-メチオニンで30秒間標識した。200 μ g/mlとなるように非放射性のメチオニンを加えて30秒後を0 timeとして一定時間間隔で菌を分取した。 35 S-メチオニンを取り込んだ σ^{32} の残量を抗体沈殿により測定した。0 timeを1として表した。

A、野生株(MC4100)にプロリン (○) もしくはアゼチジンカルボン酸 (●) を添加した。B、pUK-02pmOを持つ野生株(MC4100)にIPTGを添加し、プロウロキナーゼの合成を誘導した (●)。○はなにも添加しなかったコントロールを示す。

説明できるものであった。

異常蛋白質の合成は σ^{32} の合成を誘導しない 細胞を高温に移すと σ^{32} の安定化に加えて翻訳段階での合成誘導が起こる。異常蛋白質合成後の σ^{32} の増加が合成速度の増加によるのかどうかを調べた。野生株(MC4100)にアゼチジンカルボン酸を添加して 35 S-メチオニンで標識した後、抗体沈殿により調べたところ、 σ^{32} の合成誘導はアゼチジンカルボン酸添加ではみられなかった(図20、A、C)。アゼチジンカルボン酸の濃度を10倍高くしても合成誘導は起こらなかった(未発表データ)。pUK-02pmOを持つ野生株を用いてプロウロキナーゼ合成による σ^{32} の合成誘導を調べると、この場合にも合成誘導は起こらなかった(図20、B、C)。これらの結果と前述した結果から異常蛋白質による σ^{32} の増加は安定化のみによることがわかった。

過剰のDnaKは異常蛋白質合成による熱ショック蛋白質の合成誘導を抑制する σ^{32} の安定化がどのような機構で起こっているのだろうか。今までに σ^{32} の素早い分解に必要とされる蛋白質として熱ショック蛋白質であるDnaK、DnaJ、GrpEが知られている。これらの蛋白質が σ^{32} から離れて異常蛋白質と結合するために σ^{32} が安定化するというモデルが「序」で述べたようにStrausらにより出されている(Straus et al., 1990)。私はこのようなことが今回の系に当てはまるかどうかを調べるため、以下の実験を行った。

アゼチジンカルボン酸を添加する前にDnaKを過剰に合成させておくと、アゼチジンカルボン酸によるGroELの合成誘導が抑えられるかどうかを調

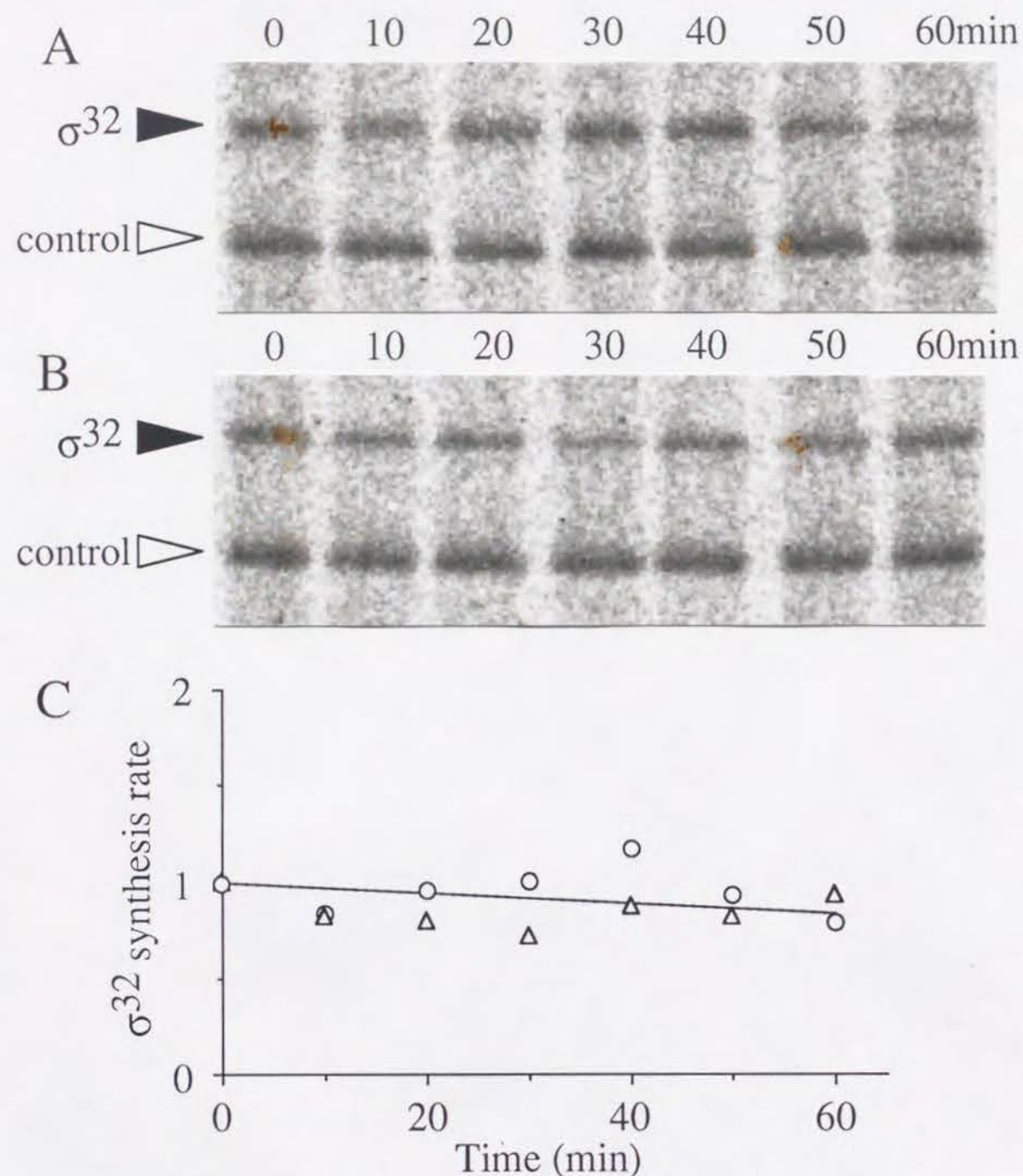


図20、異常蛋白質合成に伴う σ^{32} の合成

30 °C、合成培地で対数増殖期の細胞に図14、図17で示したように異常蛋白質を合成させ、10分間隔で100 $\mu\text{Ci/ml}$ の ^{35}S -メチオニンで30秒間標識した。 σ^{32} の合成速度を抗体沈殿により定量した。A、BにピクトログラフをCに定量の結果を示した。A、Bにおいて σ^{32} を黒矢印で操作過程の紛失を補正するために加えた分子量の小さくなった σ^{32} (*ipoH113*遺伝子産物)を白矢印で示した。A図とC図内の \circ はアゼチジンカルボン酸添加(4 $\mu\text{g/ml}$)、B図とC図内の \triangle はIPTG添加(100 μM)によるプロウロキナーゼ合成後の σ^{32} の合成速度の変化を示す。

C図は異常蛋白質合成前(0 time)の σ^{32} の合成速度を1とし、2回の実験の平均を示した。

べた。IPTGにより制御可能なプロモーターの下流に*dnaK*遺伝子を持つプラスミド(pNRK416)を野生株(MC4100)に取り込ませ、培地中のIPTGの濃度で*dnaK*の発現量を調節した。200 μM のIPTG濃度でIPTG非存在下でアゼチジンカルボン酸を加えたときのピーク値に近い速度でDnaKが合成された(図21、A)。DnaKは非常に安定な蛋白質なので合成速度の増加と量の増加は一致する。この条件下でアゼチジンカルボン酸を加えるとGroELの合成速度が低く抑えられた(図21、B)。さらにIPTGの濃度を増やしてDnaKをより過剰に合成させるとGroELの合成速度はさらに強く抑えられ(図21、B)、Strausらの提唱しているモデルとよく一致する結果が得られた。

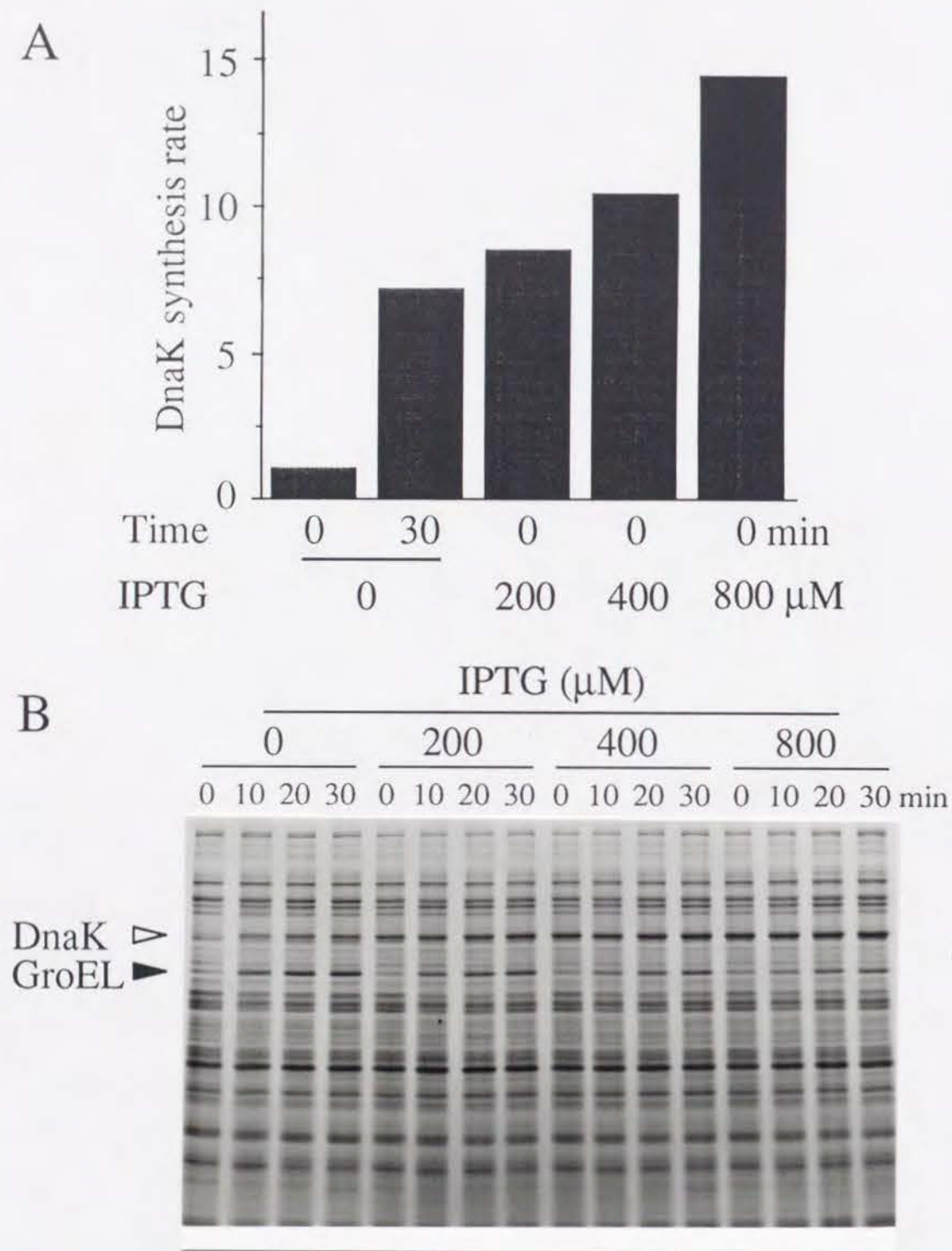


図21、異常蛋白質合成に伴う熱ショック蛋白質合成誘導に対する過剰DnaKの影響

30℃、示した濃度でIPTGを含む合成培地で対数増殖期の細胞(pNRK416を持つ野生株(MC4100))に4 μg/mlとなるようにアゼチジンカルボン酸を加えた。添加後10分間隔で100 μCi/mlの³⁵S-メチオニンで2分間標識した。A、DnaKの合成速度を抗体沈殿により定量した。培地中のIPTG濃度とアゼチジンカルボン酸を加えてからの時間を示す。IPTGなしで増殖させた菌のアゼチジンカルボン酸添加前(0 time)の合成速度を1とし、2回の実験の平均を示した。

B、全蛋白質を泳動した後のオートラジオグラフを示す。

考 察

本研究において細胞内での異常蛋白質の合成、蓄積が熱ショック蛋白質の合成を誘導する経路を明らかにした。異常蛋白質の合成時には温度シフト時(30℃→42℃)と同じく σ^{32} の細胞内含量が増加すること、しかしその増加は、 σ^{32} の安定化と合成誘導の両方が同時に起こる温度シフト時とは異なり、安定化のみによることがわかった。このことは図1、Bのbのような経路で熱ショック応答が起こることを示唆する。

第1部の「考察」でも述べたように、最近secBのnull mutantにおいて定常状態で熱ショック蛋白質の合成速度が増加していることがWildらにより報告された(Wild et al., 1993)。SecB蛋白質は分泌蛋白質に特異的な分子シャペロンであり、secB変異株ではいくつかの分泌蛋白質の分泌効率が悪くなる。この変異株内では専ら σ^{32} の安定化によって σ^{32} の増加が引き起こされていた。SecBが σ^{32} の分解に直接的に関わっているとは考えにくい。また彼らは野生株中でシグナル配列の変異のために分泌されなくなった分泌蛋白質の前駆体を合成させることによって、熱ショック蛋白質の合成速度が増加することも示した。これらの結果は定常状態のものであるが、細胞内に蓄積した分泌蛋白質の前駆体が細胞に異常蛋白質として認識されないと考えると、この結果は本研究の実験結果とよく一致する。

しかしながら以下のような可能性も否定できない。熱による熱ショック蛋白質の合成誘導は温度をシフトして5 - 10分後をピークとして急激に

起こるのに対し、今回示したような異常蛋白質の合成による熱ショック蛋白質の合成誘導はアゼチジンカルボン酸添加後ゆっくりと起こる。アミノ酸アナログの添加に比べて、温度シフト時には異常蛋白質が急激に蓄積することが予想されるが、この異常蛋白質の蓄積の速度が σ^{32} の合成誘導に大きく影響する可能性もある。すなわち急激な異常蛋白質の蓄積が σ^{32} の合成を誘導するのに必要かもしれない。そこで私は本研究のほとんどの実験では4 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でアゼチジンカルボン酸を培地に添加したが、この濃度を10倍の40 $\mu\text{g/ml}$ にして実験を行った。添加直後に菌の増殖がかなり悪くなり(図13)、より多くの異常蛋白質が合成されていることが予想されたが、 σ^{32} の合成誘導はみられなかった。温度シフトとアミノ酸アナログの取り込みにより蓄積する異常蛋白質の性質が違ふということがあるのかもしれない。今回私は細胞が定常状態で正常に増殖しているときには合成されない蛋白質という意味で異常蛋白質という言葉を使ってきたが、そのようなものの性状がもっと具体的にはっきりと定義でき、定量できるようになると、上述したようなあいまいさは解決できると思われる。

σ^{32} の安定化の機構 観察された σ^{32} の安定化の機構は、Strausらにより提唱されているモデルにより説明できる(Straus et al., 1990)。彼らは定常状態では σ^{32} にDnaK、DnaJ、GrpE蛋白質が結合してその分解を促進しているが、異常蛋白質が合成されると、これら分子シャペロンは異常蛋白質に結合するために残された σ^{32} が安定化されるのではないかと考えている。実際に本研究において異常蛋白質合成前にDnaKを過剰に合成させておくと、熱ショッ

ク蛋白質の合成誘導が抑制されることを観察した。DnaKが過剰に存在するために、異常蛋白質が合成されても奪い取られることなく σ^{32} との結合を保てると考えると彼らのモデルとよく一致する。このモデルをもっと積極的に証明する1つの方法としては、定常状態で σ^{32} と結合していたDnaKが異常蛋白質が合成されると離れてしまうということを、例えば抗体を使って共沈するかどうかを調べることが考えられる。その場合に多くの蛋白質の変性が起こると考えられるアミノ酸アナログの培地への添加よりもプロウロキナーゼのような蛋白質を合成させると、それに対する抗体を用いて σ^{32} から離れたDnaKが実際に異常蛋白質と結合していることも証明できると思われる。これらは今後の課題である。

σ^{32} の翻訳段階での合成誘導 本研究により熱ショック応答における異常蛋白質の位置づけと σ^{32} の安定化の機構はある程度わかったが、温度シフトに伴う σ^{32} の翻訳段階での合成を誘導するシグナルは未解決の問題として残された。これまでに*rpoH* mRNAの2次構造が重要であることが示されている(Nagai et al., 1991)。定常状態では*rpoH* mRNAは分子内で塩基対を形成して翻訳を阻害しているが、温度シフトと同時に塩基対が開裂して翻訳誘導が起こると考えられている。最近ではこの翻訳誘導にトランスに働く因子の存在を示唆する実験結果が示された(Yuzawa et al., 1993)。温度変化を感知する因子がどのようなものなのか、今後の解析が待たれる。

大腸菌における熱ショック応答のモデル 本研究の結果とこれまでに

報告されている結果を合わせて熱ショック応答のモデルを考えた(図22)。

低温(30℃)では $rpoH$ mRNAの翻訳は分子内2次構造の形成により、低く抑えられている。そのうえ合成された σ^{32} も素早く分解される(図中の4)ため細胞内の σ^{32} の量は非常に少ない。細胞あたり50分子以下と考えられている。高温へのシフトと同時に異常蛋白質が蓄積すると(図中の1)、DnaK、DnaJ、GrpEを含む σ^{32} の分解装置が異常蛋白質の方に吸収され(図中の3)、 σ^{32} は安定になる。異常蛋白質としては変性した既存の蛋白質と合成途上で折り畳みが異常になった蛋白質の両方が考えられる。一方、本研究で明らかにしたように異常蛋白質の蓄積とは別経路で σ^{32} の合成が翻訳段階で誘導される(図中の2)。図中ではトランスに働く因子が正の調節因子のように描いたが、今のところ因子の存在を示唆する結果は示されているが、その因子がmRNAの2次構造を破壊するような正の調節因子か、定常状態で2次構造を安定化するように働いている負の調節因子かはわからない。熱ショック応答にはこのように少なくとも2つの経路があり、最終的に σ^{32} の増加を引き起こし、熱ショック遺伝子の発現を誘導していると考えられる。

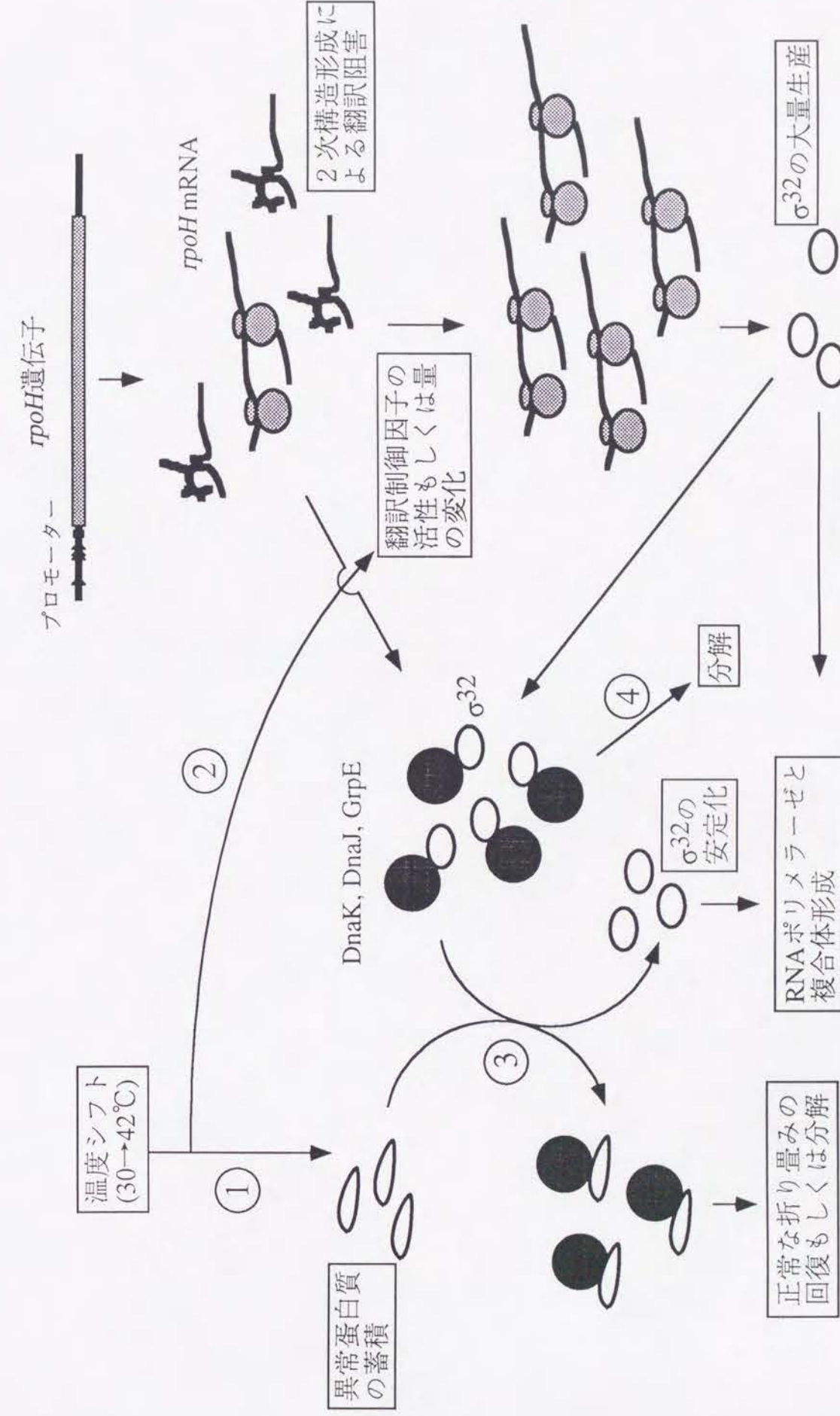


図22、大腸菌における熱ショック応答のモデル

本文参照。

謝 辞

本研究は由良隆先生をはじめとする多くの人達に支えられて行うことができました。ここに感謝の意を表します。

永田俊夫先生、大森治夫先生、和田千恵子先生、森浩禎先生、矢野良治さん、北川正成さん、楠川典子さん、片山勉さん、永井宏樹さん、川崎泰生さん、湯澤晴美さん、石合正道君、大森敏行君、江口良司君、斉藤誠君、和田淳君、松永藤彦君、安田武嗣君、研究室は異なりましたが、伊藤維昭先生、秋山芳展先生、和田明先生、富山朔二先生、上口智治さん、吉永智一君、梅本朋江さん、田浦徹也君、以上の皆さんには有益な議論をしていただきました。

秋山芳展先生、森浩禎先生、矢野良治さん、楠川典子さんには実験の方法もいろいろと教えていただきました。

三原真理子さん、田中喜代子さん、吉岡幸代さん、若山英司さん、高田泰伸さんには実験の補助をしていただきました。

C. Georgopoulos先生、今井六雄先生にはプラスミドをいただきました。

C. Gross先生には菌株および抗体をいただきました。

M. Kohiyama先生には抗体をいただきました。

東ソー（株）の山田正幸先生にはプロウロキナーゼ発現ベクターと抗体をいただきました。

皆さん、本当にありがとうございました。

引用文献

Bochkareva, E. S., N. M. Lissin, and A. S. Girshovich. 1988. Transient association of newly synthesized unfolded proteins with the heat-shock GroEL protein. *Nature* 336:254-257.

Casadaban, M. 1976. Transposition and fusion of the *lac* gene to selected promoters in *E. coli* using bacteriophage lambda and mu. *J. Mol. Biol.* 104:541-555.

Donnelly, C. E., and G. Walker. 1989. *groE* mutants of *Escherichia coli* are defective in *umuDC*-dependent UV mutagenesis. *J. Bacteriol.* 171:6117-6125.

Donnelly, C. E., and G. Walker. 1992. Coexpression of UmuD' with UmuC suppresses the UV mutagenesis deficiency of *groE* mutants. *J. Bacteriol.* 174:3133-3139.

Egan, S. E., R. Fliege, S. Tong, A. Shibata, R. E. Wolf, Jr., and T. Conway. 1992. Molecular characterization of the Entner-Doudoroff pathway in *Escherichia coli*: sequence analysis and localization of promoters for the *edd-eda* operon. *J. Bacteriol.* 174:4638-4646.

Ellis, R. J., and S. M. van der Vies. 1991. Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 60:321-347.

Fayet, O., J.-M. Louarn, and C. Georgopoulos. 1986. Suppression of the *Escherichia coli* *dnaA46* mutation by amplification of the *groES* and *groEL* genes. *Mol. Gen. Genet.* 202:435-445.

Fayet, O., T. Ziegelhoffer, and C. Georgopoulos. 1989. The *groES* and *groEL* heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J. Bacteriol.* 171:1379-1385.

Gamer, J., H. Bujard, and B. Bukau. 1992. Physical interaction between heat shock proteins DnaK, DnaJ, and GrpE and the bacterial heat shock transcription factor σ^{32} . *Cell* 69:833-842.

Gao, Y., J. O. Thomas, R. L. Chow, G.-H. Lee, and N. J. Cowan. 1992. A cytoplasmic chaperonin that catalyzes β -actin folding. *Cell* 69:1043-1050.

Georgopoulos, C., D. Ang, K. Liberek, and M. Zylicz. 1990. Properties of the *Escherichia coli* heat shock proteins and their role in bacteriophage λ growth. p.191-221. In R. Morimoto, A. Tissieres, and C. Georgopoulos (ed.), *Stress proteins in biology and medicine*. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY.

Georgopoulos, C. P., R. W. Hendrix, S. R. Casjens, and A. D. Kaiser. 1973. Host participation in bacteriophage lambda head assembly. *J. Mol. Biol.* 76:45-60.

Georgopoulos, C. P., R. W. Hendrix, and A. D. Kaiser. 1972. Role of the host cell in bacteriophage morphogenesis: effects of a bacterial mutation on T4 head assembly. *Nature New Biol.* 239:38-41.

Goff, S. A., and A. L. Goldberg. 1985. Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates transcription of *lon* and other heat shock genes. *Cell* 41:587-595.

Gragerov, A., E. Nudler, N. Komissarova, G. A. Gaitanaris, M. E. Gottesman, and V. Nikiforov. 1992. Cooperation of GroEL/GroES and DnaK/DnaJ heat shock proteins in preventing protein misfolding in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10341-10344.

Gross, C. A., D. B. Straus, J. W. Erickson, and T. Yura. 1990. The function and regulation of heat shock proteins in *Escherichia coli*. p.167-189. In R. Morimoto, A. Tissieres, and C. Georgopoulos (ed.), *Stress proteins in biology and medicine*. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY.

Hartl, F.-U., J. Martin, and W. Neupert. 1992. Protein folding in the cell: the role of molecular chaperones Hsp70 and Hsp60. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21:293-322.

Hartman, D. J., N. J. Hoogenraad, R. Condrón, and P. B. Hoj. 1992. Identification of a mammalian 10-kDa heat shock protein, a mitochondrial chaperonin 10 homologue essential for assisted folding of trimeric ornithine transcarbamoylase *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3394-3398.

Hendrick, J. P., and F.-U. Hartl. 1993. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 62:349-384.

Herendeen, S. L., R. A. VanBogelen, and F. C. Neidhardt. 1979. Levels of major proteins of *Escherichia coli* during growth at different temperatures. *J. Bacteriol.* 139:185-194.

Horwich, A. L., B. Low, W. A. Fenton, I. N. Hirshfield, and K. Furtak. 1993. Folding *in vivo* of bacterial cytoplasmic proteins: role of GroEL. *Cell* 74:909-917.

Jenkins, A. J., J. B. March, I. R. Oliver, and M. Masters. 1986. A DNA fragment containing the *groE* genes can suppress mutations in the *Escherichia coli dnaA* gene. *Mol. Gen. Genet.*

202:446-454.

Kitakawa, M., L. Blumenthal, and K. Isono. 1980. Isolation and characterization of specialized transducing λ phage carrying ribosomal protein genes of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Gen.* 180:343-349.

Kusukawa, N., and T. Yura. 1988. Heat shock protein GroE of *Escherichia coli*: key protective roles against thermal stress. *Genes & Dev.* 2:874-882.

Kusukawa, N., T. Yura, C. Ueguchi, Y. Akiyama, and K. Ito. 1989. Effects of mutations in heat-shock genes *groES* and *groEL* on protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 8:3517-3521.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Laine, P. S., and R. R. Meyer. 1992. Interaction of the heat shock protein GroEL of *Escherichia coli* with single-stranded DNA-binding protein: suppression of *ssb-113* by *groEL46*. *J. Bacteriol.* 174:3204-3211.

Liberek, K., T. P. Galitski, M. Zylicz, and C. Georgopoulos. 1992. The DnaK chaperone modulates the heat shock response of *Escherichia coli* by binding to the σ^{32} transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3516-3520.

Lindquist, S., and E. A. Craig. 1988. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22:631-677.

McCarty, J. S., and G. C. Walker. 1991. DnaK as a thermometer: threonine-199 is site of autophosphorylation and is critical for ATPase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9513-9517.

Nagai, H., R. Yano, J. Erickson, and T. Yura. 1990. Transcriptional regulation of the heat shock regulatory gene *rpoH* in *Escherichia coli*: involvement of a novel catabolite-sensitive promoter. *J. Bacteriol.* 172:2710-2715.

Nagai, H., H. Yuzawa, and T. Yura. 1991. Interplay of two cis-acting mRNA regions in translational control of σ^{32} synthesis during the heat shock response of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10515-10519.

Neidhardt, F. C., and R. A. VanBogelen. 1987. Heat shock response. p.1334-1345. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, vol. 1. American

Society for Microbiology, Washington, D. C.

O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007-4021.

O'Farrell, P. Z., H. M. Goodman, and P. H. O'Farrell. 1977. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12:1133-1142.

Parsell, D. A., and R. T. Sauer. 1989. Induction of a heat shock-like response by unfolded protein in *Escherichia coli*: dependence on protein level not protein degradation. *Genes & Dev.* 3:1226-1232.

Pearson, W. R., and D. J. Lipman. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:2444-2448.

Reeh, S., and S. Pedersen. 1979. Post-translational modification of *Escherichia coli* ribosomal protein S6. *Mol. Gen. Genet.* 173:183-187.

Ruben, S. M., S. E. VanDenBrink-Webb, D. C. Rein, and R. R. Meyer. 1988. Suppression of the *Escherichia coli* *ssb-1* mutation by an allele of *groEL*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3767-3771.

Schnier, J., M. Kitakawa, K. Isono. 1986. The nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal region containing the genes for ribosomal proteins S6, S18, L9 and an open reading frame. *Mol. Gen. Genet.* 204:126-132.

Silhavy, T. J., M. L. Berman, and L. W. Enquist. (ed.) 1984. *Experiments with gene fusions*. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY.

Sohlberg, B., U. Lundberg, F.-U. Hartl, and A. von Gabain. 1993. Functional interaction of heat shock protein GroEL with an RNase E-like activity in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:277-281.

Stahl, F. W., I. Kobayashi, D. Thaler, and M. Stahl. 1986. Direction of travel of RecBC recombinase through bacteriophage lambda DNA. *Genetics* 113:215-227.

Straus, D. B., W. A. Walter, and C. A. Gross. 1987. The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of σ^{32} . *Nature* 329:348-351.

Straus, D. B., W. A. Walter, and C. A. Gross. 1988. *Escherichia coli* heat shock gene mutants are defective in proteolysis. *Genes & Dev.* 2:1851-1858.

Straus, D., W. Walter, C. A. Gross. 1990. DnaK, DnaJ, and GrpE heat shock proteins negatively regulate heat shock gene expression by controlling the synthesis and stability of σ^{32} . *Genes & Dev.* 4:2202-2209.

Takano, T., and T. Kakefuda. 1972. Involvement of a bacterial factor in morphogenesis of bacteriophage capsid. *Nature New Biol.* 239:34-37.

Trent, J. D., E. Nimmesgern, J. S. Wall, F.-U. Hartl, and A. L. Horwich. 1991. A molecular chaperone from a thermophilic archaebacterium is related to the eukaryotic protein t-complex polypeptide-1. *Nature* 354:490-493.

VanBogelen, R. A., and F. C. Neidhardt. 1990. Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5589-5593.

Van Dyk, T. K., A. A. Gatenby, and R. A. LaRossa. 1989. Demonstration by genetic suppression of interaction of GroE products with many proteins. *Nature* 342:451-453.

Wada, M., H. Fujita, and H. Itikawa. 1987. Genetic suppression of a temperature-sensitive *groES* mutation by an altered subunit of RNA polymerase of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 169:1102-1106.

Wada, M., and H. Itikawa. 1984. Participation of *Escherichia coli* K-12 *groE* gene products in the synthesis of cellular DNA and RNA. *J. Bacteriol.* 157:694-696.

Wild, J., A. Kamath-Loeb, E. Ziegelhoffer, M. Lonetto, Y. Kawasaki, and C. A. Gross. 1992. Partial loss of function mutations in DnaK, the *Escherichia coli* homologue of the 70-kDa heat shock proteins, affect highly conserved amino acids implicated in ATP binding and hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7139-7143.

Wild, Y., W. A. Walter, C. A. Gross, and E. Altman. 1993. Accumulation of secretory protein precursors in *Escherichia coli* induces the heat shock response. *J. Bacteriol.* 175:3992-3997.

Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119.

Yura, T., H. Nagai, and H. Mori. 1993. Regulation of the heat-shock response in bacteria.

Annu. Rev. Microbiol. 47:321-350.

Yuzawa, H., H. Nagai, H. Mori, and T. Yura. 1993. Heat induction of σ^{32} synthesis mediated by mRNA secondary structure: a primary step of the heat shock response in *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res. 21:5449-5455.

Zeilstra-Ryalls, J., O. Fayet, and C. Georgopoulos. 1991. The universally conserved GroE (Hsp60) chaperonins. Annu. Rev. Microbiol. 45:301-325.

Zhou, Y.-N., N. Kusukawa, J. W. Erickson, C. A. Gross, and T. Yura. 1988. Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants that lack the heat shock sigma factor σ^{32} . J. Bacteriol. 170:3640-3649.

Zweig, M., and D. J. Cummings. 1973. Cleavage of head tail proteins during bacteriophage T5 assembly: selective host involvement in the cleavage of a tail protein. J. Mol. Biol. 80:505-518.

**Effects of Reduced Level of GroE Proteins on Protein Metabolism:
Enhanced Synthesis of Heat Shock Proteins During Steady-State
Growth of *Escherichia coli***

MASAAKI KANEMORI, HIROTADA MORI¹, AND TAKASHI YURA^{2*}

Institute for Virus Research, Kyoto University, Kyoto 606-01, Japan

(Key words: GroE protein, molecular chaperone, σ^{32} , *edd* operon, ribosomal protein)

Running title: GroE heat shock proteins

¹ Present address: Nara Institute of Science and Technology, Ikoma 630-01, Japan

² Present address: HSP Research Institute, Kyoto Research Park, Kyoto 600, Japan

*Corresponding author:

Takashi Yura

HSP Research Institute

Kyoto Research Park

Shimogyo-ku, Kyoto 600, Japan

Tel. 81-75-315-8619

Fax. 81-75-315-8659